

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

par

Bernard HUGUES

sujet :

**Contribution à l'étude de méthodes de détection
des Salmonella dans les eaux usées**

Soutenue publiquement le 25 octobre 1975 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Président : M. A. VEILLET

Examineurs : M. J. JACQUET

M. M. METCHE

Mme. L. VEILLET - PONCET

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR INGENIEUR

par

Bernard HUGUES

sujet :

**Contribution à l'étude de méthodes de détection
des Salmonella dans les eaux usées**

Soutenue publiquement le 25 octobre 1975 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Président : M. A. VEILLET

Examineurs : M. J. JACQUET

M. M. METCHE

Mme. L. VEILLET - PONCET

THÈSE

présentée à l'Université de Bruxelles

pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences

par

de

Bernard HUGUES



Contribution à l'étude de la détection
des radionucléides dans les eaux usées

Présentée par l'auteur à la Faculté des Sciences de l'Université de Bruxelles

Membres du Jury

Président : M. J. VIELLE

Examinateur : M. J. JACQUES

M. R. KITCH

Prof. J. VIELLE - PRÉSIDENT

E R R A T A

p. 176 ligne 3. lire 220/ 100 ml



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555024_0025

AVANT - PROPOS

Au moment d'exposer notre travail effectué dans le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de NICE, nous tenons à témoigner à Monsieur le Professeur VEILLET, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse, notre gratitude et notre profond respect.

A Monsieur le Professeur JACQUET, qui a bien voulu faire partie de notre Jury, nous exprimons notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur METCHE, qui a accepté d'être Membre de notre Jury, nous exprimons notre respectueuse considération.

A Madame le Docteur VEILLET, qui nous a guidé dans la réalisation de ce travail, nous l'assurons de notre gratitude et de notre sincère reconnaissance.

Nos remerciements vont également à Monsieur le Docteur PLISSIER, Directeur du Laboratoire d'Hygiène de la Ville de NICE, dont la rigueur d'esprit et le sens aigu des réalités ont inspiré ce travail.

Qu'il nous soit permis d'associer à ces remerciements,
Mesdemoiselles ROULLET M. et STROBINO L., Messieurs GAISSA J. et
PLANTAT JL., dont la minutie et l'efficacité nous ont été très précieuses.

Enfin nous ne saurions oublier toutes celles et tous ceux qui,
de près ou de loin, tant au Laboratoire d'Hygiène de la Ville de NICE,
qu'au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de NANCY, nous ont
encouragé et aidé.

- SOMMAIRE -

	Pages.
I. <u>INTRODUCTION.</u>	1
II. <u>LES <u>Salmonella</u> DANS LES EAUX USEES.</u>	7
1. <u>IMPORTANCE DE LA RECHERCHE DES <u>Salmonella</u>.</u>	7
1.1. <u>Dynamique des infections à <u>Salmonella</u>.</u>	7
1.2. <u>Enquête épidémiologique systématique.</u>	11
1.3. <u>La résistance aux antibiotiques.</u>	13
2. <u>TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DES <u>Salmonella</u>.</u>	15
2.1. <u>Les différentes techniques.</u>	15
2.1.1. Les prélèvements.	15
2.1.2. Méthodes de concentration des <u>Salmonella</u> dans les eaux usées.	17
2.1.2.1. Concentration par la méthode des gazes flottées.	17
2.1.2.2. Concentration par la méthode de filtration.	18
2.1.2.3. Concentration du milieu d'enrichissement.	20
2.1.2.4. La centrifugation.	21
2.1.2.5. Concentration par floculation.	22

2.1.3. Méthodes de préenrichissement.	23
2.1.4. Méthodes d'enrichissement.	24
2.1.4.1. Les milieux d'enrichissement.	24
2.1.4.1.1. Les différents types.	25
2.1.4.1.2. Domaine d'application.	36
2.1.4.2. Volume d'inoculation.	37
2.1.4.3. Température d'incubation.	37
2.1.4.4. Temps d'incubation.	41
2.1.5. Méthodes d'isolement.	42
2.1.5.1. Les milieux d'isolement.	42
2.1.5.1.1. Les différents types.	43
2.1.5.1.2. Domaine d'application.	50
2.1.5.2. Classification des milieux d'isolement.	51
2.2. <u>Choix des méthodes.</u>	52
2.2.1. Choix des échantillons.	52
2.2.2. Mode de prélèvement .	53
2.2.3. Choix des méthodes.	53
3. <u>TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES <u>Salmonella</u>.</u>	56
3.1. <u>Isolement.</u>	56
3.1.1. Etalement sur milieu gélosé HEKTOEN.	56
3.1.2. Inoculation du milieu de KLIGLER.	56

3.2. <u>Identification.</u>	58
3.2.1. Identifications biochimiques.	58
3.2.1.1. Epreuves extemporanées effectuées sur toutes les souches.	58
3.2.1.2. Les différents tests biochimiques.	59
3.2.2. Identifications sérologiques.	63
3.2.2.1. Vérification que la souche n'auto-agglutine pas.	63
3.2.2.2. Détermination du groupe sérologique.	63
3.2.2.3. Détermination du sérotype.	68
3.3. <u>Confirmation du typage.</u>	68

III. <u>ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CROISSANCE DES <u>Salmonella</u></u>	
<u>ET DES COLIFORMES, EN CULTURE PURE ET EN CULTURE MIXTE,</u>	
<u>DANS LES BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT AU SELENITE ET AU</u>	
<u>TETRATHIONATE.</u>	69
1. <u>MATERIEL.</u>	69
1.1. <u>Matériel de fermentation.</u>	69
1.2. <u>Compteur de colonies.</u>	70
1.3. <u>Souches bactériennes.</u>	70
1.4. <u>Milieux de culture.</u>	71
1.4.1. Milieux pour la croissance des bactéries en culture pure.	71
1.4.2. Milieux pour la croissance des bactéries en culture mixte.	72

2. <u>METHODES.</u>	73
2.1. <u>Obtention des courbes de croissance en culture pure.</u>	73
2.1.1. Dans un bouillon d'enrichissement au tétrathionate.	73
2.1.2. Dans un bouillon d'enrichissement au sélénite.	74
2.1.3. Cas de <u>S. typhi</u> .	74
2.2. <u>Obtention des courbes de croissance en culture mixte.</u>	74
2.2.1. Mélange <u>E. coli</u> - <u>S. brancaster</u> .	74
2.2.1.1. Sensibilité de la méthode.	75
2.2.1.2. Croissance du mélange bactérien dans un milieu d'enrichissement.	76
2.2.2. Mélange <u>K. pneumoniae</u> - <u>S. brancaster</u> .	77
2.2.2.1. Sensibilité de la méthode.	77
2.2.2.2. Croissance du mélange bactérien dans un milieu d'enrichissement.	78
3. <u>RESULTATS.</u>	79
3.1. <u>Développement des coliformes et des <u>Salmonella</u> en culture pure dans un milieu d'enrichissement.</u>	79
3.1.1. Influence du milieu d'enrichissement.	79
3.1.1.1. Sur les coliformes.	79
3.1.1.1.1. Action du tétrathionate de sodium.	79
3.1.1.1.2. Action du sélénite de sodium.	84

3.1.1.2. Sur les <u>Salmonella</u> .	93
3.1.1.2.1. Action du tétrathionate de sodium.	93
3.1.1.2.2. Action du sélénite de sodium.	93
3.1.1.3. Comparaison des courbes de croissance.	98
3.1.2. Cas de <u>Salmonella typhi</u> .	101
3.2. <u>Croissance de S. brancaster en présence d'un compétiteur dans un milieu d'enrichissement.</u>	104
3.2.1. Sensibilité de détection des milieux utilisés par la méthode du N.P.P.	104
3.2.2. Action du tétrathionate de sodium.	105
3.2.2.1. Mélange <u>E. coli</u> - <u>S. brancaster</u> .	105
3.2.2.2. Mélange <u>K. pneumoniae</u> - <u>S. brancaster</u> .	110
3.2.2.3. Comparaison des courbes de croissance.	115
3.2.3. Action du sélénite de sodium.	118
3.2.3.1. Mélange <u>E. coli</u> - <u>S. brancaster</u> .	118
3.2.3.2. Mélange <u>K. pneumoniae</u> - <u>S. brancaster</u> .	118
3.2.3.3. Comparaison des courbes de croissance.	128
IV <u>EFFICACITE COMPAREE DES MILIEUX D'ENRICHISSEMENT AU SELENITE ET AU TETRATHIONATE POUR LA RECHERCHE DES <u>Salmonella</u>, A PARTIR D'ECHANTILLONS D'EAUX USEES, CENTRIFUGEES OU NON.</u>	132
1. <u>MATERIEL.</u>	132
1.1. <u>Les prélèvements.</u>	132
1.1.1. Origine.	132
1.1.2. Mode de prélèvement.	133
1.1.3. Transport .	134

1.2. <u>Matériel de broyage.</u>	134
1.3. <u>Matériel d'agitation.</u>	135
1.4. <u>Milieux de culture et réactifs .</u>	135
1.5. <u>Sérums agglutinants.</u>	135
1.6. <u>Disques pour antibiogrammes.</u>	136
 2. <u>METHODE.</u>	 136
2.1. <u>Préparation de l'échantillon.</u>	136
2.1.1. Obtention d'un culot de centrifugation.	136
2.1.2. Préparation d'une solution mère.	138
2.2. <u>Isolement.</u>	138
2.3. <u>Identification.</u>	139
2.4. <u>Sensibilité aux antibiotiques.</u>	140
 3. <u>RESULTATS.</u>	 140
3.1. <u>Intérêt de la technique de concentration par centrifugation.</u>	140
3.1.1. Comparaison de deux techniques de concentration par centrifugation.	140
3.1.2. Comparaison de la technique de concentration par centrifugation avec une technique d'enrichissement direct.	144
3.1.3. Comparaison de la technique de concentration par centrifugation avec une technique d'ensemencement direct, sur milieu HEKTOEN.	152
3.1.4. Comparaison globale des méthodes.	153

3.2. <u>Recherche des <i>Salmonella</i> après enrichissement direct, simultanément sur bouillon au tétrathionate et au sélénite.</u>	155
3.3. <u>Traitement statistique des données.</u>	161
3.3.1. Comparaison des méthodes de concentration par centrifugation avec les méthodes d'enrichissement direct.	161
3.3.2. Comparaison des méthodes de concentration par centrifugation avec la méthode d'isolement direct.	163
3.3.3. Comparaison des méthodes d'enrichissement direct.	164

V. <u>DETERMINATION QUANTITATIVE DES <i>Salmonella</i> DANS LES EAUX USEES.</u>	166
1. <u>METHODE d'ETUDE.</u>	167
1.1. <u>Dénombrement des <i>Salmonella</i> par la méthode du N.P.P.</u>	167
1.1.1. Principe.	167
1.1.2. Mode opératoire.	167
1.2. <u>Numération des <i>Salmonella</i> sur des échantillons d'eaux d'égout.</u>	169
2. <u>RESULTATS.</u>	171
2.1. <u>Validité de la méthode.</u>	171
2.2. <u>Détermination de la concentration moyenne en <i>Salmonella</i>.</u>	173
2.3. <u>Effet du milieu d'enrichissement sur la numération des <i>Salmonella</i>.</u>	176

VI. <u>INVENTAIRE DES <i>Salmonella</i> DANS LES EAUX D'EGOUT.</u>	
<u>LEUR RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.</u>	185
1. <u>BILAN.</u>	185
2. <u>RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.</u>	191
VII. <u>DISCUSSION.</u>	194
1. <u>LES PRELEVEMENTS.</u>	194
2. <u>PREPARATION DE L'ECHANTILLON.</u>	195
3. <u>ACTION DU SELENITE ET DU TETRATHIONATE SUR LES COLIFORMES ET LES <i>Salmonella</i>.</u>	195
3.1. <u>En culture pure.</u>	195
3.1.1. Croissance des coliformes et des <i>Salmonella</i> dans le milieu d'enrichissement au sélénite.	195
3.1.2. Cas de <i>S. typhi</i> .	197
3.1.3. Croissance des coliformes et des <i>Salmonella</i> dans le milieu d'enrichissement au tétrathionate.	200
3.2. <u>En culture mixte.</u>	201
3.2.1. Sélection des <i>Salmonella</i> en culture mixte dans un milieu d'enrichissement au sélénite.	202
3.2.2. Sélection des <i>Salmonella</i> en culture mixte dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate.	204
4. <u>LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DES <i>Salmonella</i>.</u>	205
4.1. <u>Aspect qualitatif.</u>	205
4.1.1. Méthode de concentration par centrifugation de l'échantillon.	205
4.1.2. Méthode d'enrichissement direct.	206

4.2. <u>Aspect quantitatif.</u>	210
4.2.1. Validité de la méthode.	210
4.2.2. Comparaison des méthodes.	213
VIII. <u>CONCLUSION</u> .	215
IX. <u>ANNEXE</u> .	220
X. <u>BIBLIOGRAPHIE</u> .	226

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

N.P.P.	=	Nombre le plus probable.
S.S.	=	Milieu gélosé " <u>Salmonella-Shigella</u> ".
D.C.L.A.	=	Désoxycholate-citrate-lactose agar.
L.M.H.	=	Laboratoire Municipal d'Hygiène.
A.T.C.C.	=	American Type Culture Collection.
O.M.S.	=	Organisation Mondiale de la Santé.

I. INTRODUCTION

Depuis quelques années on assiste en France et dans le monde à une recrudescence des Salmonelloses.

La nette augmentation des Entérobactéries pathogènes, et notamment des Salmonella, dans les eaux usées urbaines présente une menace permanente pour l'environnement et la population avoisinante. Ceci étant dû :

- à l'endémicité des fièvres thypho-parathyphoïdiques,
- au nombre de plus en plus important de toxoinfections alimentaires à Salmonella,
- à la polyrésistance des Salmonella aux antibiotiques et à leur transfert entre des souches de types différents,

il est nécessaire de rechercher les moyens efficaces qui permettent d'éliminer ces bactéries pathogènes.

Les eaux usées drainent les déchets des activités humaines aussi bien domestiques qu'industrielles.

Chargées massivement et constamment de microorganismes entériques, leur rejet dans les rivières ou dans l'eau de mer apporte à celles-ci une pollution bactérienne et virale très importante. L'apparente inefficacité des traitements physiques, biologiques ou chimiques des stations d'épuration sur le plan microbiologique aggrave le problème des rejets dans le milieu récepteur.

Le déversement en mer des effluents présente pour le milieu marin et pour l'Homme un certain danger.

Ces risques sont d'autant plus grands que les phénomènes de dilution et de diffusion des effluents le long de la zone côtière sont plus ou moins rapides et que la stagnation des eaux est plus importante.

Les matières organiques en suspension dans les effluents peuvent servir de vecteur et d'éléments nutritifs à la flore microbienne pathogène pour l'Homme.

La pollution de l'eau de mer sur la bande littorale représente l'image fidèle du développement démographique et des fluctuations de la population autochtone et étrangère.

Ce fait entraîne la transmission d'un certain nombre d'affections nuisibles à la santé de l'individu. La consommation de produits marins, en contact avec l'eau de mer polluée par les eaux usées, est susceptible de provoquer des toxi-infections alimentaires. Les baignades en zones polluées peuvent être à l'origine d'épidémies et de maladies infectieuses.

Les besoins en eau augmentant constamment, les réserves dans lesquelles l'Homme puise deviennent insuffisantes. Il s'avère alors utile, dans certaines circonstances, de recycler les eaux usées. L'emploi de telles eaux dans l'industrie ou dans l'agriculture est accompagné d'un grand risque de pollution.

La nécessité d'une désinfection des effluents semble se justifier si on veut empêcher le cycle "absorption-excrétion" des Salmonella de se retenir.

Devant le coût élevé d'une épuration absolue, les solutions proposées seront fonction des risques acceptés. On déterminera, en règle générale, le traitement donnant une eau la moins polluée possible.

Pour ce faire, il faut disposer de moyens de contrôle simples et rapides. Ceci implique des recherches technologiques de mise en évidence et de mesures quantitatives des Salmonella dans les eaux usées.

Responsable de la Section MICROBIOLOGIE du Laboratoire d'Hygiène de la Ville de NICE, laboratoire régional agréé par le Ministère de la Santé et, devant les différentes méthodes de mise en évidence des Salmonella qui ne nous donnaient pas entière satisfaction, il nous est apparu qu'il était nécessaire de déterminer les conditions optimales pour la recherche des Salmonella dans les eaux usées de la ville de NICE.

Notre travail a été d'élaborer des méthodes efficaces et sensibles pour détecter qualitativement et quantitativement le plus petit nombre possible de Salmonella présentes dans les échantillons contrôlés.

Dans un premier temps, après avoir souligné l'importance des Salmonella, nous faisons le point sur les différentes techniques mises à la disposition du bactériologiste. A la lumière de ces connaissances, une comparaison rapide des méthodes est faite et notre choix est déterminé.

Les techniques retenues, une étude expérimentale est entreprise, en fermenteur, sur la croissance des Salmonella et des germes compétiteurs dans les milieux d'enrichissement au sélénite et au tétrathionate de sodium, en culture pure et mixte.

Nous comparons alors l'efficacité des milieux d'enrichissement pour la recherche des Salmonella, à partir d'eaux d'égout, centrifugées ou non. Pour un même échantillon, les analyses sont effectuées en parallèle afin de comparer statistiquement les résultats.

La détermination quantitative des germes de contamination d'origine fécale nous permet de connaître les rapports de concentration entre les Salmonella, les E. coli et les Streptocoques fécaux, et leurs variations au cours du temps.

La recherche des spectres de résistance aux antibiotiques, pour chaque Salmonella mise en évidence, est

utilisée pour émettre quelques considérations épidémiologiques. Mais nous tenons à préciser que ce travail est avant tout méthodologique et ne constitue pas une enquête.

La composition des milieux de culture utilisés et la description détaillée des techniques mises en oeuvre au cours de notre travail ne sont pas mentionnées dans notre texte, dans la mesure où quiconque peut les retrouver soit dans le Diagnostic de Laboratoire des Bacilles à Gram Négatif - I - les Enterobacteries de LE MINOR (165), soit dans le Manuel de Techniques Bactériologiques de BUTTIAUX, BEERENS et TAQUET (31).

Par contre, les milieux de culture et techniques ne figurant pas dans ces manuels sont décrits en annexe et indiqués dans notre texte par les symboles (A 1)(A 2)...

II. LES Salmonella DANS LES EAUX USEES.

1. IMPORTANCE DE LA RECHERCHE DES Salmonella.

1.1. Dynamique des infections à Salmonella.

La totalité des infections à Salmonella est le résultat d'une transmission directe ou indirecte, par un vecteur approprié, d'une dose infectante de microorganismes à partir d'une source de contamination (17). L'Homme et les animaux représentent un réservoir d'infection très important. Le circuit de transmission, comme l'indique la Fig. 1, montre clairement que les infections à Salmonella s'acquièrent par deux voies dont une, principalement par l'ingestion d'aliments contaminés.

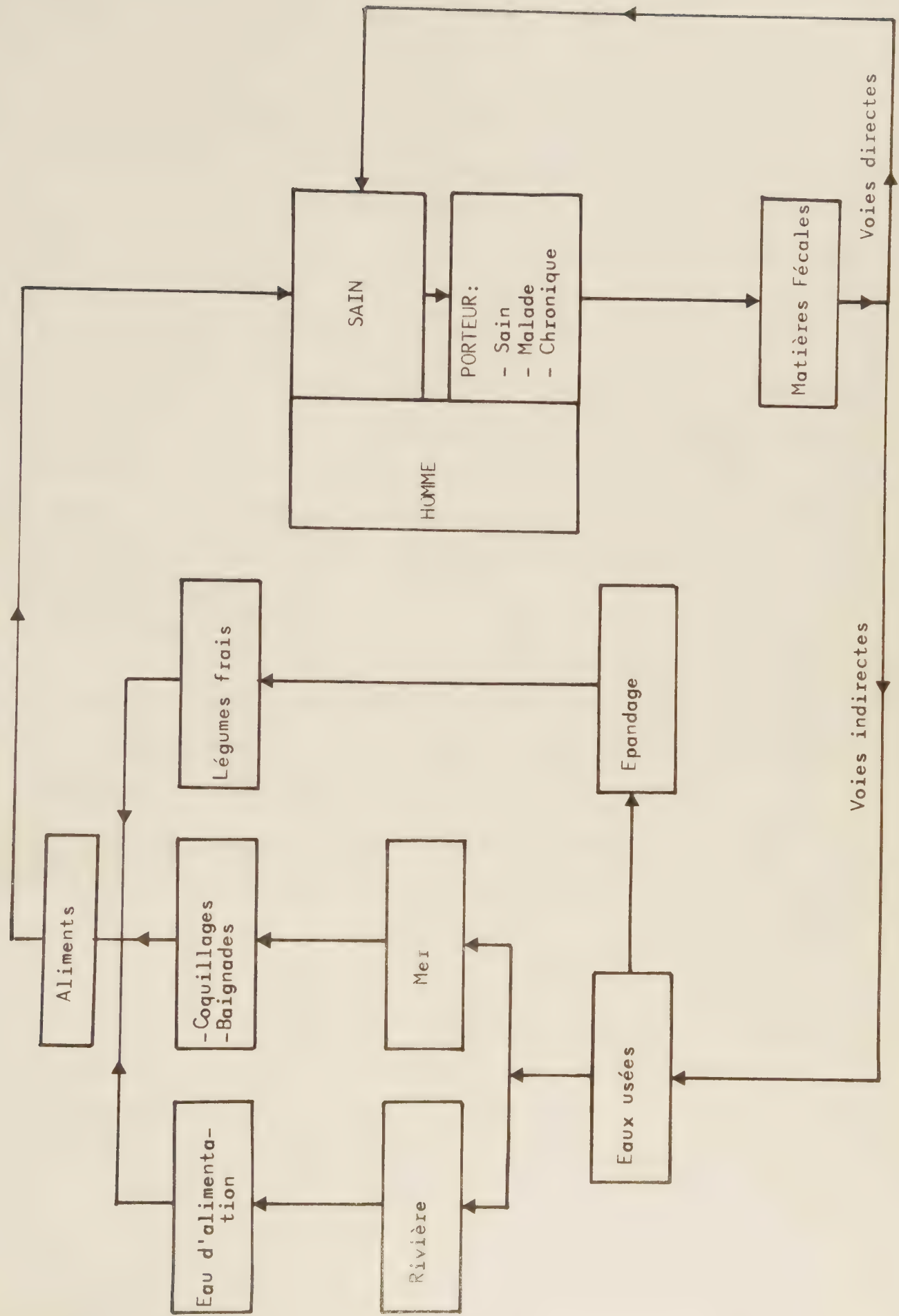
- La transmission directe à partir d'individus atteints d'infections intestinales est relativement faible dans l'extension de la maladie.

- La transmission indirecte par l'intermédiaire des aliments et de l'eau reste essentielle :

● l'eau.

./ si l'eau d'alimentation n'est plus sujette à une contamination directe par des égouts défectueux ou par des erreurs d'interconnexion des réseaux, il n'en demeure pas moins qu'elle peut servir de vecteur pour véhiculer les Salmonella.

Cycle de transmission des Salmonella



A tout moment, leur introduction dans le cycle "Aliments - Homme" peut être à l'origine d'épidémies de gastro-entérite.

./ les eaux résiduaires, de par leur nature et leurs origines, collectent tous les microorganismes pathogènes ou non. Tous ne survivent pas. L'eau d'égout acquiert vite une flore caractéristique conditionnée par les décharges de produits domestiques et industriels (59). La concentration en Salmonella est liée aux variations discontinues des apports polluants :

- individus atteints d'une infection aigüe (179) (180),
- usines de traitement de produits alimentaires (18) (64) (87) (94) (114) (123) (244) (268) (284),
- abattoirs (271).

Dans ces conditions le rejet direct des effluents présente de graves conséquences sur la santé publique (25) (219) et l'écosystème du milieu récepteur (208). Le traitement des eaux usées s'avère indispensable.

La présence de microorganismes pathogènes, après traitements physico-chimiques ou biochimiques, montre le faible pouvoir d'arrêt des stations d'épuration (19) (46) (47) (48) (135) (137) (143) (155) (157) (161) (184) (201) (211) (216) (219) (242). La destruction totale des germes n'est jamais obtenue. Le risque de contamination par les baignades, par l'ingestion de coquillages (15) (153) (237) ou le recyclage des eaux (249), demeure pour la population environnante.

● les aliments.

Les aliments, réservoirs potentiels des Salmonella, sont dans bien des cas à l'origine de toxi-infections (34).

La majorité des infections sont dûes :

- soit à l'ingestion d'aliments d'origine animale contaminés en Salmonella (44) : c'est selon BUTTIAUX (31), une contamination dite "originelle" ; ces infections ont pour origine les viandes de porc (9) (40) (74) (287), les poulets (186), les produits laitiers (20) (57) (185) (215) (286).
- soit au contact de l'aliment avec le milieu souillé. La mouche domestique peut être un agent actif de transmission.
- soit à des porteurs de germes.

Le développement de ces infections s'observe dans les pays à standing de vie élevé et paraît être la rançon du progrès industriel :

- si, il y a quelques années, un aliment souillé ne contaminait que quelques individus, aujourd'hui ce sont plusieurs centaines de personnes qui sont atteintes. Ceci est dû en partie au mode de l'alimentation collective qui se généralise dans les cantines des établissements scolaires et universitaires et les restaurants d'entreprises.

- l'industrialisation de la préparation des denrées alimentaires dans de mauvaises conditions d'hygiène, tels les plats cuisinés, les semi-conserves, les farines de viande et de poisson est la cause principale des sources de contamination.
- la distribution commerciale, sur une grande échelle, d'un produit alimentaire est le processus classique de diffusion de l'infection. L'O.M.S. cite le cas d'épidémies observées en diverses régions des Etats-Unis, du Canada et en Europe, provoquées par la consommation de chocolat (232) et de poivre blanc (233).

1.2. Enquête épidémiologique systématique.

Dans le cadre des programmes nationaux et internationaux de Surveillance des Salmonella dans les eaux usées, un certain nombre de renseignements, d'informations et de données épidémiologiques sont confrontés.

L'interprétation comparative des données permet de dégager une série de conclusions :

- les infections humaines sont en relation étroite avec la température de la saison : on isole un nombre maximum de Salmonella au printemps et en été (180) (217) (236) (238).
- les Salmonella sont détectées dans les eaux usées lorsque moins de 1 % de la population est porteuse de la Salmonella considérée (98). Ce pourcentage, confirmé par la Grande - Bretagne (192), est contesté par d'autres pays (96) (182). HARVEY (109) montre que dans une ville résidentielle de 4000 habitants, dépourvue d'industries alimentaires,

des Salmonella sont présentes.

En fait, la population minimale nécessaire pour assurer la présence des Salmonella dans les eaux usées n'est pas réellement connue (273).

- la mise en évidence d'un sérotype déterminé dans les eaux résiduaires pendant plusieurs semaines est le reflet d'un certain état endemo-épidémique, même si aucun cas clinique n'est apparent (216).
- la persistance d'une même souche, après traitement clinique, est due à son excrétion continue pendant deux à cinq semaines (84) (169).
- parmi les individus atteints d'une infection à Salmonella 3 % de ceux-ci deviennent porteurs de germes chroniques (14). Le risque de contaminer leur entourage est important, notamment les sujets non encore immunisés.
- en l'absence de porteurs de germes la chaîne de transmission est rompue. L'existence des porteurs de germes est un facteur primordial de l'écologie des germes pathogènes.
- la surveillance des Salmonella dans l'environnement et en particulier dans les eaux usées constitue un bon indicateur des sérotypes communs chez l'homme. On note ainsi l'augmentation du nombre de souches de certains sérotypes dont la fréquence chez l'homme est importante (235).

- la recherche de la lysotypie permet d'effectuer un marquage épidémiologique des souches. Elle peut permettre de conclure à la contamination d'une denrée alimentaire par un porteur de germes manipulant la denrée dans l'entreprise (31) (279).
- Enterobacteries pathogènes, les Salmonella apparaissent comme les germes les plus représentatifs d'une contamination fécale dangereuse (157) (179). Leur recherche dans les eaux usées permet d'entreprendre le dépistage des Salmonella au sein d'une population et de prévoir le danger potentiel qu'elles représentent (71).

1.3. La résistance aux antibiotiques.

● Découverte de la polyrésistance.

L'observation pour la première fois de souches multirésistantes à un grand nombre d'agents antimicrobiens, a été faite au Japon en 1955. C'est au cours d'épidémies de dyssenteries bacillaires que l'on constata, dans les selles des malades, des Shigella simultanément sensibles et résistantes aux antibiotiques. AKIBA (2) (3) met en évidence chez Shigella la présence d'un plasmide appelé "facteur de résistance" ou facteur R, capable d'être transféré en bloc ou partiellement, par contact en culture mixte, à des bactéries sensibles.

● Mode d'action.

De très nombreux travaux ont été entrepris sur le rôle, la diffusion et le mode d'action des facteurs R (6) (7) (10) (49)

(52) (77) (85) (86) (167) (212) (220) (239) (245) (250) (283).

Les résultats de ces recherches mettent en relief trois points particuliers :

- le transfert de résistance, de bactéries résistantes à bactéries sensibles, a lieu aussi bien "in vivo" (139) (282) qu'"in vitro" (134) (206).
- l'acquisition de la résistance pour une bactérie sensible n'ayant jamais été en contact avec des antibiotiques, s'effectue en l'absence d'antibiotiques. Le milieu aqueux est favorable au contact des différentes bactéries et, de ce fait, au transfert de résistance entre la flore coliforme et les Salmonella. STURTEVANT (258) indique qu'environ 1 % des Enterobacteries dégradant le lactose, présentes dans les eaux usées non traitées, sont multi-résistantes aux antibiotiques fréquemment employés pour le traitement des infections humaines et animales.
- la diffusion de la résistance se fait entre des souches de germes différents, à la vitesse analogue à celle d'une maladie se propageant dans la population.

● Implications épidémiologiques.

L'usage inconsidéré et prolongé des antibiotiques est à l'origine de l'apparition de la résistance de certaines souches à ces médicaments (234). Le risque de voir diminuer la valeur des

thérapeutiques actuelles est important (176).

Par exemple, l'efficacité du chloramphénicol dans le traitement de la fièvre typhoïde chez l'homme peut être mise en doute. Alors qu'avant 1972, on ne notait que quelques cas de résistance aux antibiotiques chez Salmonella typhi (151) (255), c'est à partir de l'apparition au Mexique en 1971, d'une épidémie de fièvre typhoïde (89) (218) (274) dont certaines souches étaient résistantes au chloramphénicol, qu'une situation nouvelle est créée. Le problème de la résistance de S. typhi au chloramphénicol, à la streptomycine et à la tétracycline est d'importance mondiale. On signale la dissémination de telles souches possédant toutes le même facteur R en Europe (7) (281) et au Viet-Nam (30) (230). On comprend combien la fièvre typhoïde posera, dans un avenir plus ou moins proche, de graves problèmes thérapeutiques, et par là même épidémiologiques. Ceci est vrai pour d'autres sérotypes de Salmonella multi-résistants aux antibiotiques.

On estime qu'approximativement 50 % des Enterobacteries pathogènes isolées à partir des malades sont résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (56).

2. TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DES Salmonella.

2.1. Les différentes techniques.

2.1.1. Les prélèvements.

● Méthode directe : prélèvements extemporanés.

Ils sont simples car ils consistent à remplir des flacons en verre ou en polycarbonate, stériles, dans le courant de l'eau

à étudier. Les volumes d'eau sont de l'ordre de quelques centaines de ml ou du litre (22) (43).

Les analyses doivent être effectuées le plus rapidement possible après le prélèvement. Si le temps de transport est long, il est nécessaire de mettre les prélèvements dans une enceinte isotherme, à + 4° C.

Cette méthode ne fournit qu'une image instantanée du niveau de contamination au moment du prélèvement. Si elle s'avère bonne pour des eaux chargées, son efficacité peut être mise en doute pour des eaux de moindre pollution.

● Méthode des gazes flottées.

La technique consiste à immerger dans l'eau, pendant plusieurs heures, des tampons de gaze. A travers la trame les matières organiques en suspension dans l'eau s'y fixent. Avec elles, les bactéries sont adsorbées à leur surface. Après un temps de contact variable la gaze est prélevée et placée dans un flacon stérile. La quantité d'eau recueillie est relativement faible. Les résultats obtenus par cette méthode sont purement qualitatifs, ils donnent des éléments pour effectuer des enquêtes épidémiologiques.

BRISOU (24), comparant les deux méthodes, note que les sérotypes isolés à partir des gazes, ne correspondent pas toujours à la somme de ceux isolés par prélèvements extemporanés.

2.1.2. Méthodes de concentration des Salmonella.

Pour isoler des germes pathogènes avec le maximum de chances, il est pratiquement nécessaire d'examiner de grands volumes d'échantillons. Le nombre de Salmonella étant généralement restreint, comparé à celui des coliformes, il importe d'employer une technique de concentration.

2.1.2.1. Concentration par la méthode des gazes flottées.

MOORE (194) (196) décrit pour la première fois, en 1948, une méthode pour concentrer les Salmonella présentes dans les eaux d'égout. A partir d'une pièce de gaze, il découpe 72 lanières de 10 centimètres de large, qui sont reliées par un cordonnet solide pour former un tampon. Il place cette gaze dans un courant d'eau à 1 mètre au-dessous de la surface de l'eau. Il se produit un enrichissement bactérien du jus imprégnant le tampon. Le temps d'immersion est très variable : de quelques heures il peut être poursuivi pendant plusieurs jours (45) (46) (203) (256). Le délai optimum semble être de 24 heures (22) (291). Les résultats obtenus après un contact de 2, 3, 4 ou 5 jours ne paraissent pas supérieurs, car un relargage des bactéries adsorbées et un "lessivage" des gazes est à craindre. D'autre part, un colmatage des fibres peut intervenir d'autant plus rapidement que l'eau est chargée en particules et en huiles lourdes. La matière des fibres utilisée est très diverse. Si la plupart des auteurs emploient la gaze (58) (102) (103) (104) (107) (108) (109) (197) (240) (243) (276), d'autres (138) (203)

(291) lui préfèrent des éponges en mousse de polyéthylène ou en cellulose, des tampons d'ouate ou des cylindres d'alginate. Les tampons sont placés dans un bocal stérile. A l'arrivée au laboratoire, on exprime manuellement le maximum de liquide. La totalité de l'extrait représente environ 300 ml: quantité suffisante quand il s'agit d'une eau d'égout. Cette méthode présente des inconvénients en bien des points (71) (156) :

- Elle ne permet pas de connaître le volume d'eau passé à travers la gaze.
- Elle est d'une sensibilité limitée par rapport aux autres méthodes de concentration.
- Elle ne donne aucune indication quant aux variations qualitatives et quantitatives des Salmonella qui s'adsorbent sur les fibres.
- Elle ne fournit aucun renseignement sur la présence exacte des Salmonella dans l'eau. Le rapport entre les bactéries adsorbées et présentes réellement dans l'eau, est inconnu.
- Elle nécessite une préparation du matériel et demande un temps supplémentaire au niveau du prélèvement.

2.1.2.2. Concentration par la méthode de filtration

● La filtration sur membrane filtrante.

Le principe de ce procédé est l'enrichissement en germes pathogènes à la surface de la membrane. Les bactéries en suspension s'adsorbent dans la trame des filtres.

La composition chimique de la membrane joue un rôle important dans le phénomène d'adsorption. Il est recommandé d'employer des membranes en nitrate de cellulose, plutôt qu'en acétate.

La vitesse de filtration peut faire varier l'adsorption. Plus le débit de filtration est grand, plus le colmatage des pores est rapide et moins l'adsorption est importante.

Si la technique de filtration sur membrane est utilisée avec bonheur pour les eaux potables (21) (51) (171), pour les eaux de rivières, lacs et fleuves (28) (45) (68), quand les eaux sont peu chargées (16) (43) (46) (58) (72) (93) (127) (174), il n'en est pas de même pour les eaux plus chargées en matières en suspension, telles les eaux usées où il faut préalablement traiter l'échantillon pour le rendre plus limpide.

Pour l'obtention de ce résultat, la préfiltration sur membranes en fibres de verre (22) (43) est la méthode la plus communément utilisée. Si le liquide est très chargé, une seule préfiltration ne suffit pas : il faut utiliser jusqu'à 6 à 12 membranes (22). Pour éviter l'emploi successif de plusieurs préfiltres, l'échantillon peut être soumis à une centrifugation. Le surnageant étant passé ultérieurement sur le préfiltre (55).

A la technique de filtration sur préfiltres et membranes filtrantes, on peut combiner, conjointement, une méthode utilisant la terre d'infusoire (43). La capacité de filtration de

celle-ci est employée pour concentrer un grand nombre de microorganismes présents dans l'échantillon (99) (174). On additionne aseptiquement dans l'eau à étudier 2 à 3 g/l de terre d'infusoire stérile. Dans de telles conditions, plusieurs litres peuvent être filtrés lentement. Après filtration, la membrane filtrante, le préfiltre, et la terre d'infusoire sont placés dans un bouillon d'enrichissement. Cette méthode recommandée par "le Standard Method" (5) nous a donné de bons résultats (non publiés). L'inconvénient majeur est la lenteur de la filtration. Il faut compter plusieurs heures pour filtrer 1 à 2 litres.

● Autres types de matériel filtrant.

Le choix du matériel filtrant est fonction de la charge en matières en suspension de l'échantillon d'eau soumis au contrôle.

Les solutions proposées telles que l'emploi de Supercel (174), de Stérimat (195) ou de coton stérile (179) donnent des résultats très variables.

2.1.2.3. Concentration du milieu d'enrichissement.

Au lieu de concentrer l'inoculum c'est le milieu d'enrichissement qui est concentré : l'eau de l'échantillon sert à ramener la teneur en substances nutritionnelles à la normale. La quantité d'eau à ajouter est calculée pour obtenir une concentration finale simple.

Les résultats obtenus par cette méthode (291) montrent que le nombre de Salmonella isolées est comparable à celui observé par la méthode des gazes flottés et de plus est même supérieur à la méthode de filtration sur membrane.

Le temps de préparation de l'échantillon est pratiquement nul. Cette technique, rapide et simple, ne nécessite aucun équipement spécial.

Elle présente l'inconvénient d'avoir un prix de revient élevé par rapport aux autres méthodes, car la quantité de produits déshydratés employée est importante.

2.1.2.4. La centrifugation.

On applique une force centrifuge suffisante pour entraîner la sédimentation des bactéries et matières en suspension présentes dans l'échantillon.

Les germes adsorbés à la surface des particules organiques (113) (157) (216) (273) sont concentrés dans le culot de centrifugation. Les sédiments récupérés sont transférés, soit directement sur une gélose d'isolement (46) (174), soit dans des bouillons d'enrichissement (55).

C'est une méthode simple permettant de traiter des volumes de l'ordre du litre pour les centrifugations discontinues, ou des volumes plus conséquents pour des centrifugations continues (61). La charge en matières en suspension importe peu. L'obtention des sédiments est rapide et est fonction de la vitesse de centrifugation (46) (55). Il n'existe pas de phénomène de colmatage.

2.1.2.5. Concentration par floculation.

L'introduction d'un hydrate métallique à un échantillon d'eau, dans certaines conditions, donne naissance à un précipité très adsorbant qui rassemble les bactéries (69). Le choix du produit et de la dose à utiliser est fonction de la composition de l'eau.

La formation du précipité dépend étroitement du pH et des forces ioniques dans le milieu. Un léger changement peut favoriser l'élution des bactéries qui se séparent du précipité. Une agitation modérée aide sa formation. Les sédiments formés sont inoculés dans le bouillon d'enrichissement.

Ces techniques, utilisées comme traitement d'épuration des eaux usées, n'assurent pas une précipitation de 100 % des bactéries.

DUNLOP (69), sur une eau d'irrigation, trouve que la floculation avec le sulfate ferrique à un pH de 9, donne de meilleurs résultats dans les isollements des coliformes qu'avec le sulfate d'aluminium ou le chlorure ferrique. Le sulfate d'aluminium semble avoir un effet bactéricide sur les organismes. L'efficacité du procédé dépend de la bonne connaissance des paramètres physico-chimiques de l'eau. La reproductibilité est aléatoire.

2.1.3. Méthodes de préenrichissement.

L'utilisation du bouillon de préenrichissement a pour avantage de revivifier les germes intestinaux rejetés dans les eaux usées. L'emploi d'un bouillon nutritif, peu sélectif, permet aux bactéries-agressées ou détruites en partie par les inhibiteurs physico-chimiques présents dans les eaux polluées- d'être remises dans un état physiologique compatible avec leur développement.

Si en bactériologie alimentaire le passage dans un bouillon de préenrichissement est d'usage courant et s'avère très utile (119) (191) (204) (260), l'emploi de cette technique pour les eaux d'alimentation (4) (42) (64) (80) (158) et pour les eaux usées (159) ne permet pas de conclure à son efficacité certaine.

Pour les eaux résiduaires, son emploi n'est pas indispensable. Il peut être même, dans certaines conditions, un élément d'inhibition à la recherche des Salmonella. En effet, l'utilisation de milieux non spécifiques entraîne un développement excessif des coliformes aux dépens des Salmonella. Dans notre laboratoire, des essais ont été tentés qui ont confirmé l'inefficacité de cette méthode. D'autre part, il est pratiquement reconnu que les Salmonella dans les eaux usées ne sont pas "choquées" à un point tel que le préenrichissement soit nécessaire (43). Enfin le

préenrichissement requiert un temps d'incubation de 24 heures supplémentaires qui augmente d'autant la durée du contrôle.

2.1.4. Méthodes d'enrichissement.

Il est généralement admis que pour la mise en évidence des Salmonella le passage des échantillons dans un bouillon d'enrichissement est bien supérieur à l'isolement direct sur gélose (37) (38) (224) (267). Ce stade s'avère nécessaire lorsque les germes compétiteurs Gram négatifs surpassent très largement en nombre les Salmonella (252).

2.1.4.1. Les milieux d'enrichissement.

La valeur d'un bouillon d'enrichissement est fondée sur son aptitude à favoriser le développement des Enterobacteries pathogènes tout en inhibant les autres germes d'origine entérique. Sa sélectivité est fonction de la destruction de la flore aerobie normale : le sélénite et le tétrathionate de sodium sont parmi les agents sélectifs les plus communément employés. A partir de ces éléments de base, l'introduction dans le milieu d'inhibiteurs tels que colorants, bile, antibiotiques, confère une meilleure action inhibitrice au bouillon.

2.1.4.1.1. Les différents types. oooooooooooooooooooo

* le bouillon d'enrichissement au tétrathionate.
.....

● le bouillon de base.
.....

- mode d'action.

./ Le bouillon d'enrichissement au tétrathionate est un mélange complexe de sels iodés et de polythionates. Le mélange tétrathionate et thiosulfate de sodium affecte la croissance des bactéries qui ne réduisent pas le tétrathionate : celui-ci est toxique pour E. coli (210). Dans une série de travaux, POLLOCK (222) (223) et KNOX (148) (149) (150) concluent que le tétrathionate de sodium est l'élément le plus actif du milieu ; ils démontrent que toutes les bactéries -telles que les Salmonella, Proteus et Pseudomonas aeruginosa - réduisant le tétrathionate peuvent se développer librement dans le milieu, alors que le reste de la flore bactérienne est inhibé (148).

Cependant KNOX (148) et SMITH (252) notent de nombreuses exceptions entre la possibilité pour les bactéries de réduire le tétrathionate et leur aptitude de se développer dans ce bouillon.

Bien que d'autres polythionates soient formés, le mélange tétrathionate - thiosulfate neutralise les effets des tri-pentathionates.

La formation de tétrathionate est réalisée lors de la préparation. Il est le résultat de l'oxydation, en milieu neutre, du thiosulfate présent dans le milieu, par l'iode ajoutée au moment de l'emploi. La réaction est la suivante :



Les produits résultants de la décomposition du tétrathionate de sodium sont neutralisés par le carbonate de calcium.

La présence de sels biliaires permet l'inhibition des germes ne vivant pas nécessairement dans l'intestin.

Du fait que les tétrathionates soient thermolabiles on ne peut stériliser le milieu après l'adjonction de l'iode.

./ La réaction paraît identique au processus anaérobie d'oxydation. L'action sélective du tétrathionate pour les Salmonella nécessite selon POLLOCK et coll. (223), la présence d'un donateur d'hydrogène dans le milieu de culture ainsi qu'une deshydrogenase spécifique et une coenzyme, transporteur d'hydrogène.

LE MINOR (164) et PAPA VASSILIOU et coll. (214), recherchant le mécanisme enzymatique, mettent en évidence chez la plupart des Salmonella une tétrathionate - réductase qui n'est pas présente chez E. coli. Ils suggèrent que la possession de cette enzyme pourrait être utilisée comme test biochimique différentiel.

Le tétrathionate de sodium (209) et le thiosulfate de sodium (226) se combinent avec les groupes sulfhydriles libres des enzymes entraînant ainsi leur inactivation. Ceci suggère que le bouillon au tétrathionate intervient dans la synthèse et l'activité des enzymes (210).

- Discussion.

EDWARD et EWING (27) pensent que le bouillon au tétrathionate de MULLER (202), modifié par KAUFFMAN (140) (141) est un bouillon d'enrichissement très efficace (142). HOAG et ROGER (115) mentionnent qu'ils isolent fréquemment S. typhi murium à partir du bouillon au tétrathionate. SHARMA et PARKER (248), en contaminant artificiellement des matières fécales de cochons et de vaches avec quatre sérotypes de Salmonella, mettent en évidence un plus grand nombre de résultats positifs quand les échantillons sont ensemencés dans le bouillon au tétrathionate. Toutefois, ils démontrent l'inefficacité de ce milieu pour la mise en évidence de S. cholerae suis. BANWART et AYRES (13), étudiant l'effet du tétrathionate sur la croissance de plusieurs cultures pures de Salmonella, précisent que le milieu est définitivement inhibiteur pour S. paratyphi A et retarde le développement de S. give. De même, HURLEY et AYRES (124) prouvent que le tétrathionate est plus inhibiteur pour S. pullorum que le sélénite. Si, à partir d'échantillons de fèces, POLLOCK (220) trouve que l'isolement des Salmonella est nettement augmenté par l'enrichissement avec le bouillon au sélénite, bien d'autres auteurs préfèrent l'utilisation du

bouillon au tétrathionate (12) (40) (45) (62) (69) (91) (114)
(133) (174) (191) (198) (200) (256) (286).

● Les bouillons dérivés.
.....

./ Le milieu de MULLER-KAUFFMAN (140) (141).

L'adjonction de vert brillant au milieu de base, assure à celui-ci une efficacité plus grande en inhibant la flore secondaire Gram positive (142).

LE MINOR (165) préconise l'utilisation systématique de ce milieu pour la recherche des Salmonella à partir des coprocultures. VASSILIADIS (275) (277), TRICHOPOULOS (271), TAYLOR (260), MORRIS (200) à partir de denrées alimentaires, COULANGE et MAYOUX (55) à partir d'eaux usées, l'emploient comme milieu d'enrichissement et notent sa supériorité par rapport aux autres bouillons.

./ Le milieu m - tétrathionate.

Il a la même composition que le bouillon d'enrichissement de base, à la différence près qu'il ne contient pas de carbonate de calcium. Il est recommandé par DIFCO de l'utiliser comme un bouillon d'enrichissement devant recevoir une membrane filtrante. Pour KABLER et coll. (136) la présence de carbonate de calcium rend la recherche des Salmonella très aléatoire.

Dans une étude comparée de numération des Salmonella à partir d'eaux polluées, CHU MING CHENG (43) confirme que le bouillon m-tétrathionate donne de meilleurs résultats. Il trouve dans une eau d'égout cinq fois plus de Salmonella en utilisant le bouillon m-tétrathionate par comparaison avec l'utilisation du bouillon tétrathionate ordinaire.

. / Les milieux modifiés par des agents sélectifs.

- Modification apportée par GALTON et coll. (76).

GALTON propose, pour améliorer la sélectivité du bouillon, l'addition de sulfathiazole de sodium. DUNLOP (61) dans un essai comparé avec le bouillon de base au tétrathionate en montre la supériorité.

- Modification apportée par JEFFRIES (133).

Du fait que les Proteus réduisent le tétrathionate comme les Salmonella, JEFFRIES constate que l'addition de 0,04 g/l de novobiocine inhibe la croissance des Proteus. BUTTIAUX (33) confirme cette action sélective. Les travaux de LECLERC (159) (160) sur la recherche des Salmonella dans les eaux résiduaires en donnent la démonstration.

- Modification apportée par JAMESON (130).

L'addition de laurylsulfate dans le milieu d'enrichissement au tétrathionate donne une meilleure sélectivité pour la recherche de Salmonella à partir d'eaux d'égout .

* le bouillon d'enrichissement au sélénite.
.....

● le bouillon de base.
.....

- mode d'action.

./ Ce milieu est relativement simple : à côté de l'agent sélectif le sélénite acide de sodium ou de strontium (39) (129), ce milieu contient un sucre et une peptone.

Si pour LEIFSON (163) la peptone employée est de peu d'importance, pour SMITH (251), au contraire, la croissance des Salmonella est fonction de l'aptitude du sélénite à se lier partiellement aux peptides.

Le rôle du phosphate disodique est double: Il sert de tampon de pH et limite la toxicité du sélénite de sodium.

./ SMITH (251), dans son étude sur le mécanisme de l'action du sélénite de sodium, conclut que le sélénite réagit avec les composés soufrés pour former des complexes séléno-polythionates et séléno-soufrés, qui agissent sélectivement comme des agents inhibiteurs de croissance. La sélectivité, due au sélénite de sodium, paraît être liée à l'aptitude des germes à utiliser les différentes sources de soufre.

La réduction du sélénite est, à la fois, extra et intracellulaire. Dès 1925, LEVINE (170) pense à un phénomène intracellulaire en trouvant des particules à l'intérieur des microorganismes ou adhérant à leur surface. Cette observation est confirmée plus tard par SMITH (251) qui, outre la réduction du sélénite en sélénium, montre la présence de particules libres de sélénium dans le milieu.

La réduction du sélénite suit la croissance bactérienne. Elle a lieu quand le développement maximum est atteint. La réduction peut être suivie par le changement de coloration du jaune au rouge-brique.

Durant les six à douze premières heures d'incubation, la réduction du sélénite n'intervient pas, ceci n'empêchant pas cependant l'action sélective du bouillon sur les bactéries non pathogènes.

- Discussion.

LEIFSON (163), HOBBS et ALLISON (117) (118), COOK et coll. (53), LJUTOV (174) trouvent le bouillon au sélénite supérieur au bouillon au tétrathionate pour l'isolement de S. typhi. De même, ARMSTRONG (8) et THOMAS (265) démontrent la supériorité du bouillon au sélénite pour l'isolement de Shigella sonnei. Par contre, GOHAR (88) observe que la présence de plusieurs sérotypes de Salmonella dans le milieu au sélénite rend les autres germes en compétition plus résistants. SMITH (252) note que le bouillon au sélénite est toxique pour S. cholerae suis, S. anatum et S. abortus ovis. LEIFSON (163) confirme le haut degré de toxicité du bouillon au sélénite pour S. cholerae suis. GREENFIELD et BIGLAND (92) étudiant l'effet du sélénite sur plusieurs sérotypes, considèrent que S. cholerae suis, S. gallinarum, S. pullorum et S. typhi ne se développent pas bien et plus particulièrement lorsque les cultures sont incubées à + 43° C.

Malgré ces inconvénients, de nombreux travaux prouvent qu'à partir d'échantillons d'eaux, ce bouillon donne de bons résultats (45) (48) (50) (68) (105) (109) (113) (188) (203) (243) (259) (273) (291).

● Les bouillons dérivés.

./ Le milieu au sélénite et à la cystine.

La cystine est capable d'annuler l'effet toxique du sélénite sur la croissance des Salmonella. Si le développement de S. typhi murium, dans un tel milieu, est favorisé (205) (251), celui de S. cholerae suis n'est pas affecté.

La croissance d'E. coli et de Proteus étant grandement favorisée (227) (251), cette prolifération présente un gros désavantage (260) surtout lorsque l'échantillon étudié est très chargé en germes de contamination fécale.

./ Le milieu au sélénite, vert-brillant et mannitol.

Le bouillon de base au sélénite n'est pas satisfaisant quand il se trouve en présence d'une forte teneur en matières organiques. Ce désavantage, selon STOKES et OSBORNE (257), peut être limité par l'adjonction d'un sulfonamide, la sulfapyridine, qui permet de rétablir les propriétés sélectives du bouillon et ainsi d'inhiber les Proteus et E. coli, tout en laissant aux Salmonella le pouvoir de se multiplier.

Ce bouillon contient du vert brillant et du taurocholate de sodium comme agents sélectifs et du mannitol comme hydrate de carbone.

Le bon tamponnement du milieu évite que les germes soient "choqués" par l'acidification importante due à la fermentation du mannitol.

Les résultats de RAJ (227) montrent que ce milieu inhibe complètement la croissance de S. typhi, S. typhi murium et S. enteritidis. Par contre, il met en relief une bonne croissance des coliformes, des Pseudomonas et des Proteus, ce qui est en contradiction avec les travaux de PARVERY (217) qui utilise ce milieu parce qu'il défavorise le développement des Proteus. Cet auteur admet l'élimination de certains sérotypes de Salmonella.

Pour la recherche des Salmonella dans les eaux, un certain nombre d'auteurs l'emploie avec succès (33) (36) (45) (46) (216) (256).

./ Le milieu au sélénite et au dulcitol.

Le remplacement du lactose par le dulcitol et la présence d'extrait de levure assurent une meilleure sélectivité des Salmonella: d'une part, en inhibant partiellement la flore secondaire indésirable (227), d'autre part en permettant la croissance d'un plus grand nombre de sérotypes de Salmonella. Quoique SMITH (251) observe une amélioration dans la croissance de S. typhi murium, beaucoup d'autres résultats ne montrent pas de différence significative si l'on remplace le lactose par le

dulcitol, le saccharose ou le mannitol (13) (163) (260) (264). SMITH et coll. (254), VAN DONSEL (273), parviennent à prouver que ce milieu, dans certaines conditions, permet de mettre en évidence un nombre respectable de Salmonella.

Dans une comparaison des différents milieux à base de sélénite plusieurs auteurs (124) (193) (205) (227) (264) estiment qu'aucun de ces bouillons n'est parfaitement satisfaisant.

* le bouillon d'enrichissement de RAPPAPORT.

L'agent sélectif est ici constitué par la combinaison du chlorure de magnésium et du vert malachite : ces éléments ralentissent de façon importante le développement d'E. coli, de Proteus, de Klebsiella et de Pseudomonas, sans gêner la croissance de Salmonella (228) (229).

Si, selon RAPPAPORT, ce milieu est très supérieur aux autres dans la recherche des Salmonella il présente l'inconvénient d'inhiber la croissance de S. typhi et de Shigella (227).

IVESON (128), VASSILIADIS (277), TRICHOPOULOS (268 - 272) confirment l'efficacité de ce milieu lors du contrôle des produits alimentaires.

HOFER (121), en modifiant ce milieu par l'addition de tétrathionate de sodium et en remplaçant le vert malachite par du jaune de métachrome, obtient un rendement encore plus élevé de mise en évidence des Salmonella.

* Le bouillon d'enrichissement de HAJNA.

Ce milieu est destiné à l'enrichissement de toutes les bactéries Gram négatives.

Le désoxycholate et le citrate de sodium sont des agents bactéricides pour les germes Gram positifs.

Le système tampon phosphate mono et dipotassique, maintient la valeur du pH dans une zone favorable à la croissance des microorganismes.

Même si Proteus et Pseudomonas peuvent se développer dans ce milieu, la croissance des Salmonella et des Shigella y est favorisée (97).

DUNN (62) conclut dans son étude de comparaison des bouillons d'enrichissement avec les milieux d'isolement que l'emploi du bouillon HAJNA avec un milieu solide, tel le désoxycholate-citrate-lactose agar, est la meilleure combinaison pour l'isolement des Salmonella et des Shigella.

Dans notre laboratoire, après plusieurs années de pratique, nos conclusions sont très différentes. La mise en évidence des Salmonella a été très faible à partir de nos échantillons d'eaux (résultats non publiés).

La liste des différents milieux d'enrichissement n'est pas limitative : Si nous avons décrit les principaux, ceux que nous avons testés, il en reste encore beaucoup d'autres à la disposition du bactériologiste.

2.1.4.1.2. Domaine d'application. oooooooooooooooooooo

* technique de l'enrichissement direct.

Si l'on veut isoler des Salmonella à partir d'eaux très chargées en microorganismes et en matières organiques en suspension, il est nécessaire d'inoculer celles-ci dans des bouillons d'enrichissement qui permettent la croissance des Salmonella.

Le problème est de savoir si un seul enrichissement est suffisant ?

La plupart des auteurs répondent par l'affirmative. Le passage par un deuxième enrichissement augmente le temps et le coût du contrôle : ceci peut être un désavantage si son efficacité n'est pas démontrée.

* technique de l'enrichissement secondaire.

Un second enrichissement peut être avantageux quand un des germes en compétition avec la Salmonella, s'est développé aux dépens de celle-ci. Le passage dans un deuxième bouillon peut supprimer le germe compétiteur (131).

Les résultats de EDEL et KAMPELMACHER (65), HARVEY et PRICE (102), JAMESON (132), MARTIN et EWING (187) démontrent qu'un enrichissement secondaire dans un milieu au tétrathionate ou au sélénite assure un isolement plus important de sérotypes de Salmonella. TRICHOPOULOS (268 - 272), VASSILIADIS (277)

constatent que, lorsque le deuxième enrichissement est fait dans le milieu de RAPPAPORT, l'isolement des Salmonella est bien supérieur à tout autre milieu.

2.1.4.2. Volume d'inoculation.

==.==.==.==.==.==.==.==.==.==

Il est très variable selon les auteurs. LECLERC (160) note un effet toxique pour des volumes d'échantillon d'eaux usées supérieurs à 100 ml. Il constate la présence de Salmonella beaucoup plus fréquemment dans les petits volumes, de l'ordre du ml. Ceci est en contradiction avec HEINRICH (112), LEVINGSTONE (173) et POPP (225) qui obtiennent de meilleurs rendements en utilisant de grands volumes d'échantillon d'eaux résiduaires. Selon MAC COY (179), il faut au moins 100 ml d'eaux d'égout pour isoler des Salmonella : il démontre qu'une augmentation de six fois le volume d'eaux examinées, accroît de plus du double le pourcentage des Salmonella isolées.

Pour YOSHPE (291), il n'y a pas de corrélation entre le volume d'inoculum employé et le nombre de Salmonella isolées à partir de celui-ci. Le nombre de sérotypes trouvés n'est pas fonction du volume inoculé. Il dépend de la quantité de Salmonella présentes dans l'échantillon au moment de l'inoculation.

2.1.4.3. Températures d'incubation.

==.==.==.==.==.==.==.==.==.==

Les avis sur le choix de la température d'incubation des milieux d'enrichissement sont très partagés. Si des auteurs sont favorables à la température de + 37° C (22) (28) (36) (48) (50) (69) (70) (203) (286), beaucoup d'autres préconisent une

incubation à une température plus élevée pour la détection des Salmonella.

* Les différentes températures utilisées.
.....

L'idée d'augmenter la température d'incubation des bouillons d'enrichissement n'est pas nouvelle. WILSON (288), en 1938, démontre que l'incubation à une température élevée augmente la sélectivité de son milieu. HARVEY et THOMPSON (110) notent, à partir d'eaux usées, un meilleur isolement des Salmonella lorsque le bouillon au sélénite est incubé à + 43° C ; ils confirment par la suite la supériorité du choix de cette température (106) (109). En 1958, le LONDON METROPOLITAN WATER BOARD (175) recommande l'emploi d'une température élevée pour la mise en évidence des Salmonella. JAMESON (131) montre qu'en effectuant des dénombrements de S. litchfield à différentes températures la croissance est plus rapide à une température supérieure à + 37° C. Employant les gazes de MOORE, SPINO (256), en 1966, fait état de résultats constamment positifs dans la recherche des Salmonella en appliquant au bouillon d'enrichissement une température d'incubation élevée. De même, EDEL et KAMPELMACHER (65) (66), en 1968 et 1969, dans une étude comparative effectuée dans huit laboratoires européens, démontrent l'importance du facteur température. A partir de 1970, de nombreux auteurs généralisent l'emploi de cette technique (11) (12) (78) (159) (160) (198).

La gamme des températures utilisées par l'ensemble des auteurs se situe aux alentours de $+ 42^{\circ} \text{C} \pm 1$.

Si certains auteurs (41) (45) (114) (119) (131) (197) (203) (254) (256) (273) relatent que la température de $+ 41^{\circ} \text{C}$ est celle qui convient le mieux à l'isolement des Salmonella, d'autres considèrent que la température optimale pour l'obtention de la meilleure action inhibitrice sur les germes de la flore secondaire est de $+ 42^{\circ} \text{C}$ (81) (175) (291).

La grande majorité préfère la température de $+ 43^{\circ} \text{C}$ comme étant celle qui favorise la meilleure sélection des Salmonella (11) (12) (27) (36) (60) (65) (66) (78) (82) (83) (91) (106) (109) (110) (159) (160) (198) (269) (270) (277) (286).

* But de l'élévation de la température d'incubation.
.....

L'augmentation de la température favorise l'inhibition des germes en compétition avec les Salmonella. Comparée à la température de $+ 37^{\circ} \text{C}$, une température plus élevée entraîne une meilleure sélection des Salmonella. Selon JAMESON (131), pour une concentration donnée du produit sélectif, l'effet bactériostatique qui s'exerce à $+ 37^{\circ} \text{C}$ sur les germes en compétition devient bactéricide à plus haute température sans pour cela gêner la croissance des Salmonella.

Pour LECLERC (159) (160) quelle que soit la nature du milieu d'enrichissement, l'élévation de la température entraîne l'inhibition de Pseudomonas dans les eaux d'égout .

Comme MORRIS et DUNN (198), NABBUT (203) démontre que l'incubation à + 41° C permet aux Salmonella de se développer en culture relativement pure aux dépens des coliformes, Proteus et Pseudomonas : Ceci est d'autant plus intéressant que les eaux usées contiennent un grand nombre de bactéries Gram négatives d'origine fécale. Ces résultats diffèrent de ceux de MAC COY (180) qui trouve que le bouillon au tétrathionate, incubé à + 43° C est toxique pour les Salmonella. GRAU et SMITH (91), observant une diminution des isolements de Salmonella confirment les constatations de MAC COY. Cependant, comme l'ont montré MORRIS et MARTIN (200), WELLS (286) ne met pas en évidence cet effet léthal à + 43° C pour les Salmonella.

* Discussion.

La comparaison entre la température d'incubation de + 37° C et + 43° C des bouillons d'enrichissement montre une sensibilité tellement accrue à + 43° C qu'il paraît peu souhaitable d'en utiliser une autre. WELLS (286), comparant les températures d'incubation de + 37° C et + 43° C, démontre qu'il peut mettre en évidence dans du lait une Salmonella par litre par utilisation de la température d'incubation élevée. Dans le même esprit, BRISOU (22), BUCCI (28), LECLERC (159), NABBUT (203), à partir d'eaux usées et fluviales évaluent l'efficacité du procédé et apportent les mêmes conclusions.

Le paramètre température est donc fondamental : comparé aux autres facteurs pris chacun séparément, il est sans aucun doute l'un des plus efficaces pour isoler les Salmonella (159) (160). Cependant, si la réduction du nombre de bactéries interférentes est sensible, on risque, par l'utilisation de cette technique, d'inhiber la croissance de quelques sérotypes de Salmonella (92).

2.1.4.4. Temps d'incubation.

Ce temps est fonction de nombreux paramètres :

- nature du bouillon d'enrichissement.

Selon LEIFSON, le bouillon d'enrichissement au sélénite n'est pas suffisamment toxique pour inhiber complètement la croissance des coliformes : c'est durant les premières heures de culture que leur nombre décroît. LEIFSON recommande alors de pratiquer un isolement après six heures.

Dans la pratique, le temps d'incubation du milieu au sélénite est variable : si certains auteurs pratiquent un isolement dès que la réduction du sélénite se manifeste par une coloration rouge du milieu (251) (273), d'autres préconisent une durée d'incubation de 24 heures (12) (48) (113) (193) ou même de 48 heures (22) (50) (104) (159) (188) (227).

Pour le bouillon d'enrichissement au tétrathionate le temps minimum d'incubation est de 24 heures. De nombreux auteurs préconisent une durée d'incubation de 48 heures (159) (180) (198).

- nombre de Salmonella présentes .

MAC COY (180) démontre que le temps optimum d'incubation de ces bouillons d'enrichissement est fonction du nombre de Salmonella présentes dans l'échantillon : plus l'échantillon est bactériologiquement contaminé, plus le temps d'incubation doit être court.

- compétition entre les différents sérotypes de Salmonella.

Lorsque les circonstances ne permettent pas de faire plusieurs isollements au cours du temps à partir d'un même échantillon, MAC COY (180), MOORE (195), YOSHPE (291) préconisent d'isoler les Salmonella après 48 ou 72 heures d'incubation afin de mettre en évidence un nombre plus important de sérotypes. En effet, comme l'explique JAMESON (131), les sérotypes majoritaires sont décelés après 24 heures d'incubation en bouillon d'enrichissement ; les autres, minoritaires dans les premières heures d'incubation, atteignent la phase stationnaire après 72 heures, alors que les premiers sont dans la phase de déclin.

2.1.5. Méthodes d'isolement.

2.1.5.1. Les milieux d'isolement.

Un milieu d'isolement sera considéré comme valable s'il assure une sélection des Salmonella à partir d'une population bactérienne hétérogène. L'idéal serait l'utilisation d'un milieu de culture gélosé qui inhiberait à la fois les bactéries dégradant le lactose et celles ne le dégradant pas telles que Proteus, Pseudomonas tout en permettant aux Salmonella de se développer.

La sélectivité du milieu de culture est ici essentielle. Si cette caractéristique fait défaut, la croissance de la flore secondaire arrive à masquer celle des Salmonella. L'apport d'agents sélectifs ne doit pas entraîner, même partiellement, l'inhibition de certains sérotypes de Salmonella. La différenciation entre les colonies dégradant ou non le lactose est obtenue par la présence, dans le substrat, de lactose et d'un indicateur de pH.

Certains milieux de culture contiennent, en outre, des substances permettant la mise en évidence de la production d'hydrogène sulfuré qui se traduit par la formation de précipité de sulfures noirs au niveau des colonies bactériennes.

2.1.5.1.1. Les différents types. oooooooooooooooooooo

* le milieu gélosé au vert brillant (142).
.....

● le milieu de base .
.....

- mode d'action -

Le vert brillant à la concentration de 0,0125 g/l de milieu assure une action inhibitrice sur les bactéries Gram positives.

La présence de lactose et de saccharose dans ce milieu permet de distinguer la flore secondaire par rapport aux Salmonella qui ne dégradent ni le lactose ni le saccharose dans la majorité des cas.

La dégradation de ces deux sucres en acides est mise en évidence par un indicateur de pH, le rouge de phénol.

- discussion -

MOATS et coll. (190), en accord avec d'autres auteurs (13) (62) (69) (116) (152) (154) (193) (243) (260) (264) trouvent que le milieu gélosé au vert brillant et au rouge de phénol est un milieu à recommander.

Testés parallèlement avec le milieu "Salmonella - Shigella" (61) et le milieu de MAC CONKEY (227) la détection des Salmonella est rendue plus aisée par la sélectivité du milieu gélosé au vert brillant.

Ce milieu est cependant trop inhibiteur pour S. typhi, pour certains autres sérotypes (31) (90) et pour Shigella (263) ; de nombreux auteurs lui reprochent de plus, de n'être pas inhibiteur pour les Proteus. Cette affirmation est contestée par GUINEE et KAMPELMACHER (95) qui démontrent que le milieu gélosé au vert brillant, dans des conditions de stérilisation bien précises, inhibe les Proteus. ADAM (1) recommande une addition de 0,2 % de desoxycholate de sodium pour inhiber les Proteus.

● Les milieux dérivés.
.....

./ Le milieu gélosé au vert brillant et à la sulfadiazine de sodium.

De même composition que le milieu précédent, l'addition de

sulfadiazine de sodium, améliore sensiblement sa sélectivité (41) (43) (74) (114) (213) (276) (285) : il élimine en partie les coliformes (286) mieux que ne le fait le milieu de WILSON et BLAIR (198) (286).

./ le milieu gélosé au vert brillant et à la sulfapyridine.

MOATS et KINNER (190), confirmant les résultats de OSBORNE et STOKE (207), prouvent que dans la famille des sulfonamides l'action de la sulfapyridine est bien supérieure aux autres agents sélectifs. Sa présence dans le milieu augmente les propriétés sélectives et résoud en partie le problème posé par la croissance des bactéries en compétition.

* le milieu gélosé "Salmonella-Shigella" (S.S.) (152).
.....

- mode d'action -

L'inhibition des germes Gram positifs est obtenue par l'action des sels biliaires et du vert brillant.

Le thiosulfate de sodium en présence du citrate de fer met en évidence les bactéries capables de former du sulfure de fer noir. La présence du citrate de sodium, à forte concentration, permet d'inhiber avec plus ou moins de succès les coliformes.

- discussion -

Si pour certains (41) (46) (50) (55) (62) (69) (203) (217), ce milieu donne entière satisfaction, pour beaucoup d'autres

il n'en est pas de même, car trop inhibiteur pour Shigella (126) (147) (221).

La performance du milieu gélosé "S. S." dans l'isolement des Enterobactéries pathogènes est très inférieure aux milieux gélosés HEKTOEN et xylose - lysine - desoxycholate (221). Comparé aux milieux gélosés de WILSON et BLAIR et au vert brillant, RAJ (227) trouve que le milieu gélosé "S. S." donne de moins bons résultats.

* le milieu desoxycholate - citrate - lactose - agar (D.C.L.A.)
 (125 - 162).

- mode d'action -

Les concentrations relativement importantes en desoxycholate et citrate de sodium, inhibent la croissance des germes Gram positifs.

Selon que le lactose et le citrate de sodium sont dégradés, l'acidification et l'alcalinisation produites se traduisent par un virage de l'indicateur de pH, le rouge neutre. La réduction du thiosulfate de sodium en sulfure de fer noir est rendue possible par la présence du citrate de fer ammoniacal.

- discussion -

L'action inhibitrice du desoxycholate de sodium sur la croissance des coliformes démontrée par HYNES (125) et LEIFSON (162) est confirmée par DUNN (62), HARVEY et coll. (109), JAMESON (131).

Cependant RYAN (243) ne peut mettre en évidence sur un tel

substrat la présence de S. typhi à partir d'eaux d'égout : pour lui la fermentation rapide du lactose provenant du développement des coliformes abaisse suffisamment le pH du milieu pour inhiber la croissance de S. typhi. La différenciation des colonies sur ce milieu n'est pas facile : les Citrobacter et Enterobacter utilisant lentement le lactose peuvent être confondus avec les Salmonella.

* le milieu gélosé de WILSON et BLAIR (289) (290).
.....

- mode d'action -

La sélectivité du milieu repose sur l'action conjuguée du vert brillant et du sulfite de bismuth.

Pour les bactéries réduisant le sulfate ferreux en sulfure de fer il y a apparition d'un noircissement au centre de la colonie.

La réduction des ions bismuth en bismuth métal confère parfois autour des colonies concernées, un reflet métallique (179).

- discussion -

C'est un milieu considéré par beaucoup d'auteurs comme hautement sélectif, présentant un minimum de colonies prêtant à des erreurs d'interprétation (22) (62) (188) (189) (198) (277) (286).

Ce milieu de culture permet d'isoler les rares sérotypes de Salmonella dégradant le lactose (20) (75) (167) car la différenciation n'est pas basée sur l'utilisation de ce sucre qui est absent.

Il est cependant inhibiteur pour certains sérotypes de Salmonella (13) et pour Shigella (62).

* le milieu de MAC CONKEY (177) (178).
.....

- mode d'action -

La teneur du milieu en sels biliaires et en cristal violet inhibe la croissance des bactéries Gram positives. La présence du chlorure de sodium assure un meilleur développement des Salmonella et des Shigella.

L'indicateur de pH, le rouge neutre, permet une différenciation entre les Enterobactéries dégradant le lactose et les Salmonella.

- discussion -

Les auteurs (62) (101) (165) sont unanimes pour reconnaître que ce milieu est moins sélectif que les milieux "S.S." et "D.C.L.A ".

HARVEY (109) et THOMSON (266) mentionnent que le milieu de MAC CONKEY additionné de vert brillant permet une meilleure sélectivité de Salmonella, en particulier de S. paratyphi B.

* Xylose, lysine et desoxycholate agar (261) (262).
.....

- mode d'action -

Les bactéries décarboxylant la lysine en cadavérine entraînent une alcalinisation du milieu faisant virer l'indicateur de pH, le rouge de phénol, au rouge.

La dégradation du xylose, lactose et saccharose s'accompagne d'un virage au jaune de l'indicateur de pH.

L'adjonction de thiosulfate de sodium et de citrate de fer ammoniacal, permet de révéler le sulfure de fer noir lorsque les bactéries réduisent le sulfate de fer.

L'influence du pH est très importante. Les meilleurs résultats sont obtenus à pH 7,4.

- discussion -

C'est un milieu favorable à la croissance des Shigella et Salmonella mais BUTTIAUX (31) pense que Shigella dysenteriae ne s'y développe pas.

Dans des études comparatives de milieux d'isolement (62) (191) (221), le milieu xylose-lysine et desoxycholate agar est considéré comme hautement sélectif, assurant un fort pourcentage d'isolement des Salmonella.

* le milieu gélosé HEKTOEN (146) (147).
.....

- mode d'action -

La grande quantité de peptone équilibre l'effet inhibiteur des sels biliaires.

La dégradation du lactose, du saccharose et de la salicine permet de différencier de nombreuses colonies.

L'indicateur de pH, le bleu de bromothymol et le réactif d'Andrade sont atoxiques. La présence des substances permettant la production d' H_2S permet d'observer des colonies bactériennes à centre noir.

- discussion -

Ce milieu, comme le précédent, présente l'avantage de ne pas inhiber la croissance des Shigella.

Comparée au milieu "S.S." (126) (147) (221) le milieu HEKTOEN est bien supérieur pour la mise en évidence des Enterobacteries pathogènes.

Comparé au milieu xylose-lysine-desoxycholate agar DUNN (62) et POLLOCK (221) montrent que le milieu gélosé HEKTOEN a une sélectivité relativement faible ; par contre, KING et METZGER (146) (147) et GOO (90) le trouvent hautement sélective ; ISENBERG et coll. (126) ne peuvent déterminer leur choix car ils considèrent que ces deux milieux ont des performances pratiquement égales. Cependant, les différents auteurs sont unanimes pour considérer que le milieu "HEKTOEN" présente le pourcentage maximum de mise en évidence des Salmonella et le taux minimum de colonies bactériennes prêtant à confusion.

2.1.5.1.2. Domaine d'application.
oooooooooooooooooooo

A partir des cultures en bouillon d'enrichissement, une $\varnothing$ se est prélevée et est étalée à la surface du milieu gélosé sélectif

préalablement séché.

La température d'incubation généralement utilisée est celle de + 37° C. Une température supérieure n'améliore pas les résultats (50).

Le temps d'incubation varie de 24 à 48 heures. Au delà, l'étalement des colonies est à craindre.

2.1.5.2. Classification des milieux d'isolement.

Suivant leur aptitude à inhiber plus ou moins la croissance des coliformes, des Pseudomonas, des Proteus et à donner un minimum de réactions faussement positives, on distingue :

- les milieux faiblement sélectifs :

Le milieu de MAC CONKEY inhibe les organismes Gram positifs et permet de différencier les germes qui dégradent ou non le lactose. L'inhibition de la flore secondaire Gram négative, coliformes en particulier, est relativement faible : ainsi, à partir d'une eau d'égout, l'envahissement par les bactéries utilisant le lactose est de règle générale.

- les milieux moyennement sélectifs :

De nombreuses et récentes études (62) (126) (147) (199) (221) (241) (261) (262) (263), montrent la supériorité des milieux HEKTOEN et xylose-lysine-desoxycholate sur les milieux traditionnellement utilisés pour l'isolement des Salmonella et Shigella.

Outre la sélectivité incontestée de ces milieux, on note une bonne croissance des Shigella et Salmonella.

A notre connaissance aucun auteur ne signale la suppression de certains sérotypes de Salmonella après passage sur de tels milieux.

Les colonies qui s'y développent se différencient facilement.

- les milieux hautement sélectifs :

Lorsque le nombre de bactéries Gram négatifs dégradant le lactose est très supérieur aux Enterobacteries pathogènes, on est tenté d'utiliser des milieux très sélectifs. Leur emploi (milieu "S.S.", milieu de WILSON et BLAIR, "D.C.L.A." et milieu gélosé au vert brillant) suppose qu'on prend le risque de ne pas trouver tous les sérotypes de Salmonella.

2.2. Choix des méthodes.

2.2.1. Le choix des échantillons.

Deux possibilités nous sont offertes :

- soit utiliser des échantillons artificiellement reconstitués, enrichis en Salmonella,
- soit prendre des échantillons naturels d'eaux usées et ainsi se trouver dans les conditions réelles de contrôle, face aux difficultés techniques.

Nous choisissons de travailler sur des échantillons naturellement contaminés pour être dans les conditions normales d'analyse et pouvoir ainsi en tirer des conclusions pratiques.

2.2.2. Mode de prélèvement.

La méthode de prélèvement par la gaze flottante ne se prêtant pas à des études quantitatives nous effectuons des prélèvements extemporanés.

2.2.3. Choix des méthodes.

Les paramètres qui ont déterminé les orientations de notre étude sont fondés sur des notions pratiques :

- de rapidité de manipulation,
- de simplicité de mise en oeuvre,
- de sensibilité de la méthode,
- du prix de revient des examens.

De plus, le choix des milieux d'enrichissement et d'isolement a été fait en fonction des problèmes posés par la recherche de l'ensemble des sérotypes de Salmonella.

● Méthode de concentration de l'échantillon.

Voulant déterminer l'intérêt éventuel d'une concentration préalable de l'échantillon, il nous apparait que la méthode de centrifugation est la plus adaptée à notre problème.

● Bouillon d'enrichissement.

./ Nature du milieu.

La revue bibliographique, étant donné la diversité des résultats, ne nous a pas donné une idée exacte de l'efficacité des différents bouillons.

Nous utilisons donc, au cours de notre travail :

- le milieu au sélénite de sodium,
- le milieu au tétrathionate, avec ou sans carbonate de sodium.

./ Température d'incubation.

Devant les résultats peu encourageants obtenus en utilisant la température d'incubation de + 37° C, nous avons recherché une température plus efficace à la sélection des Enterobacteries pathogènes : celle de + 43° C nous semble la plus apte à nous satisfaire.

./ Temps d'incubation.

En fonction des critères de rapidité et d'efficacité, nous choisissons la durée d'incubation de 24 heures, comme répondant le mieux à nos conditions de travail.

● Milieu d'isolement.
.....

./ Nature du milieu.

Nos premières études concernant le choix du milieu à retenir nous ont conduit à éliminer à la fois les milieux trop inhibiteurs vis à vis de certaines Enterobacteries pathogènes et pas suffisamment sélectifs, telle la gélose de MAC CONKEY. Notre choix s'est fixé sur un nouveau milieu, la gélose HEKTOEN qui, selon ses auteurs KING et METZGER (146) (147) et malgré

un degré de sélectivité moyen, a l'avantage d'isoler un grand nombre de bactéries pathogènes.

Pour améliorer la sélectivité et l'efficacité de ce milieu, il nous a paru intéressant d'incorporer un antibiotique, la novobiocine (32) (100) (120) (133) et de renforcer sa teneur en agar.

./ Température et temps d'incubation.
.....

Nous nous sommes conformés au choix classique de + 37° C pendant une période d'incubation de 24 heures.

3. TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES Salmonella.

Dans notre étude nous utilisons toujours les mêmes techniques biochimiques et sérologiques d'identification des Salmonella. Pour ne pas alourdir le compte-rendu des méthodes, nous l'indiquons dans ce paragraphe.

Les résultats sont ventilés dans les différents chapitres.

3.1. Isolement.

3.1.1. Etallement sur milieu HEKTOEN.

A partir des cultures en bouillon d'enrichissement au tétrathionate et au sélénite, un isolement est effectué sur milieu gélosé HEKTOEN, additionné de novobiocine et d'agar.

Après 24 heures d'incubation à + 37° C, deux à cinq colonies bactériennes isolées -présentant les caractères morphologiques et biochimiques des Salmonella - sont retenues et ensemencées sur milieu gélosé de KLIGLER.

3.1.2. Inoculation du milieu de KLIGLER.

Sur ce milieu gélosé, glucosé, lactosé -formé d'une pente et d'un culot- le culot est ensemencé par piqûre et la pente par plusieurs stries longitudinales. Après 24 heures (maximum) d'incubation à 37° C, les différents caractères biochimiques sont observés. La culture sur un tel milieu permet de juger du pouvoir glucidolytique de la souche inoculée, de la production d'hydrogène sulfuré et éventuellement de la formation des gaz accompagnant ou non la dégradation des sucres.

Le thiosulfate réduit par certaines bactéries en hydrogène sulfuré, réagit avec les sels ferriques et donnent du sulfure de fer noir. Parfois, la production d'hydrogène sulfuré est inapparente, en raison de la forte acidification du milieu (29) (280).

La dégradation des sucres avec formation d'acides, est révélée par le virage du rouge orangé au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol. Une alcalinisation se traduit par une coloration rouge foncé.

La fermentation du glucose en acide se produit seulement en couches profondes, car, par suite de la faible concentration en glucose (1%), vu l'importance de la source azotée, (20%) l'utilisation de celle-ci entraîne en surface, en aérobiose, la formation d'ammoniaque qui masque l'acidité sur le plan incliné (278). Le culot seul est jaune, la tranche demeure rouge.

Par contre si le lactose, dont la concentration est élevée, (10%) est utilisé il y a virage du milieu aussi bien dans l'épaisseur de la couche que sur le plan incliné. L'alcalinisation provoquée en aérobiose est supplantée par l'acidification provenant de l'utilisation du lactose.

La culture à la surface de la pente est utilisée :

● pour rechercher la β -galactosidase et effectuer des ensemencements sur différents milieux de culture permettant l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques :

- la coloration de Gram,
- l'oxydase,
- l'uréase,
- l'indole,
- la tryptophane - désaminase,
- la lysine - décarboxylase,
- la gélatine,
- la mobilité,
- le métabolisme glucidique :
 - . polyalcools : mannitol, dulcitol, sorbitol,
 - . diholosides : saccharose,
- le malonate.

● pour déterminer :

- les caractères antigéniques.

3.2. Identification.

3.2.1. Identification biochimique.

Pour tous les tests auxquels sont soumises les souches, nous utilisons, comme référence, des souches bactériennes connues.

3.2.1.1. Epreuves extemporanées effectuées sur toutes les souches.

* coloration de Gram.
.....

Elle nous permet de répartir nos souches en deux grands

groupes : les Gram positifs et les Gram négatifs.

* recherche de l'oxydase.
.....

Enzyme qui catalyse la réoxydation du cytochrome, réduit par l'hydrogène moléculaire.

Pour sa mise en évidence, on utilise la technique de KOVACS.

Dans le cas d'une réaction positive, on obtient la formation d'une semi-quinone rouge qui, étant très instable, s'oxyde rapidement en formant un composé noirâtre.

On utilise, comme souches de référence, Pseudomonas aeruginosa et E. coli.

3.2.1.2. Les différents tests biochimiques.

* recherche de la β -galactosidase.
.....

Ce test est effectué selon la technique de LE MINOR et BEN HAMIDA (166). Sa lecture se fait après une incubation de 30 mn à 24 h à + 37° C. Si la souche possède une β -galactosidase, l'orthonitrophényl - β D - galactopyranoside est hydrolysé, comme le lactose, en donnant de l'orthonitrophénol de couleur jaune.

* recherche de l'uréase pour les souches ne possédant pas
.....
de β -galactosidase.
....

Elle est effectuée sur le milieu de FERGUSSON, modifié par

ROLAND, BOURBON et SZTURM. C'est un milieu dit "combiné" permettant de rechercher, outre l'uréase, l'indole et la tryptophane désaminase.

L'observation de ces réactions a lieu après une incubation à + 37° C, pendant 24 heures.

- recherche de l'uréase.

Les germes qui utilisent l'urée comme source d'azote, élaborent une uréase qui permet son hydrolyse. Il y a formation de carbonate d'ammonium, d'où une nette alcalinisation du milieu, qui se traduit par la coloration rouge du rouge de phénol.

- recherche de l'indole.

L'indole est un catabolite de dégradation du tryptophane qui, par hydrolyse donne aussi de l'acide pyruvique.

L'indole donne avec le réactif de KOVACS, en milieu acide, une coloration rouge qui apparaît en se concentrant dans la phase alcoolique, sous forme d'anneau à la surface.

- recherche de la tryptophane-désaminase.

La désaminase est une enzyme qui se forme en milieu alcalin.

Quelques bactéries, comme les Proteus et Providencia, possèdent cette enzyme capable de catalyser la désamination du

L - tryptophane en acide β -indolpyrurique qui donne avec le perchlorure de fer une coloration rouge-brun.

* recherche de la mobilité.
.....

Cette recherche se fait sur milieu "mannitol-mobilité" qui donne deux réponses :

- ✱ fermentation ou non du mannitol,
- ✱ mise en évidence de la mobilité.

- mobilité.

L'inoculation du milieu peptoné gélosé à 40/00 en piqure centrale sur le culot permet, après incubation à + 37° C pendant 24 heures, d'évaluer la mobilité.

L'incorporation du nitrate de potassium au milieu, permet d'inhiber l'hydrogenelyase et d'éviter ainsi la production de bulles de gaz.

- dégradation du mannitol.

La dégradation du mannitol conduit à la formation d'acides à chaînes très courtes, tels l'acide acétique et l'acide formique.

* recherche de la lysine décarboxylase.
.....

L'ensemencement d'un milieu au monochlorhydrate de L - lysine, selon la méthode de FALKOV à + 37° C pendant 24 heures, permet d'observer la transformation - en milieu acide - par l'action d'une décarboxylase de la L - lysine en cadavérine qui alcalinise le milieu et fait virer au violet l'indicateur du pH, le pourpre de bromocrésol.

* recherche de la gélatinase.

La mise en évidence d'une enzyme protéolytique par hydrolyse de la gélatine est faite selon la méthode de KOHN. L'incubation à + 37° C se poursuit pendant plusieurs jours. L'observation de la liquéfaction de la gélatine se fait de 24 heures en 24 heures.

* étude des fermentations sucrées.

Elle est effectuée sur milieu liquide en tubes de DURHAM.

Les sucres testés sont les suivants :

- mannitol, sorbitol, dulcitol,
- saccharose.

La dégradation de ces glucides s'accompagne généralement de l'apparition de produits finaux tels que : alcools, aldehydes et acides stables ou volatiles, avec ou sans dégagement de gaz. On évalue qualitativement, après incubation à + 37° C pendant 24 heures, la formation d'acide par le virage d'un indicateur de pH et la présence ou l'absence de gaz dans les cloches.

* recherche de l'action des souches sur un sel organique :

le malonate de sodium.

La mise en culture sur ce milieu pendant 48 heures à + 37° C, permet d'observer l'utilisation du malonate par virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, du vert au bleu intense.

3.2.2. Identifications sérologiques.

Ce n'est qu'après l'identification par les caractères biochimiques que l'on soumet la souche présumée de Salmonella à l'identification sérologique. Faute de se soumettre à ce protocole, il y a un risque important de trouver une multitude de réactions croisées.

Pour le diagnostic sérologique des Salmonella nous avons utilisé la méthode recommandée par LE MINOR (165).

3.2.2.1. Vérification que la souche n'auto-agglutine pas.

On réalise dans une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame de verre (10 x 18 cm) une suspension avec les germes à étudier.

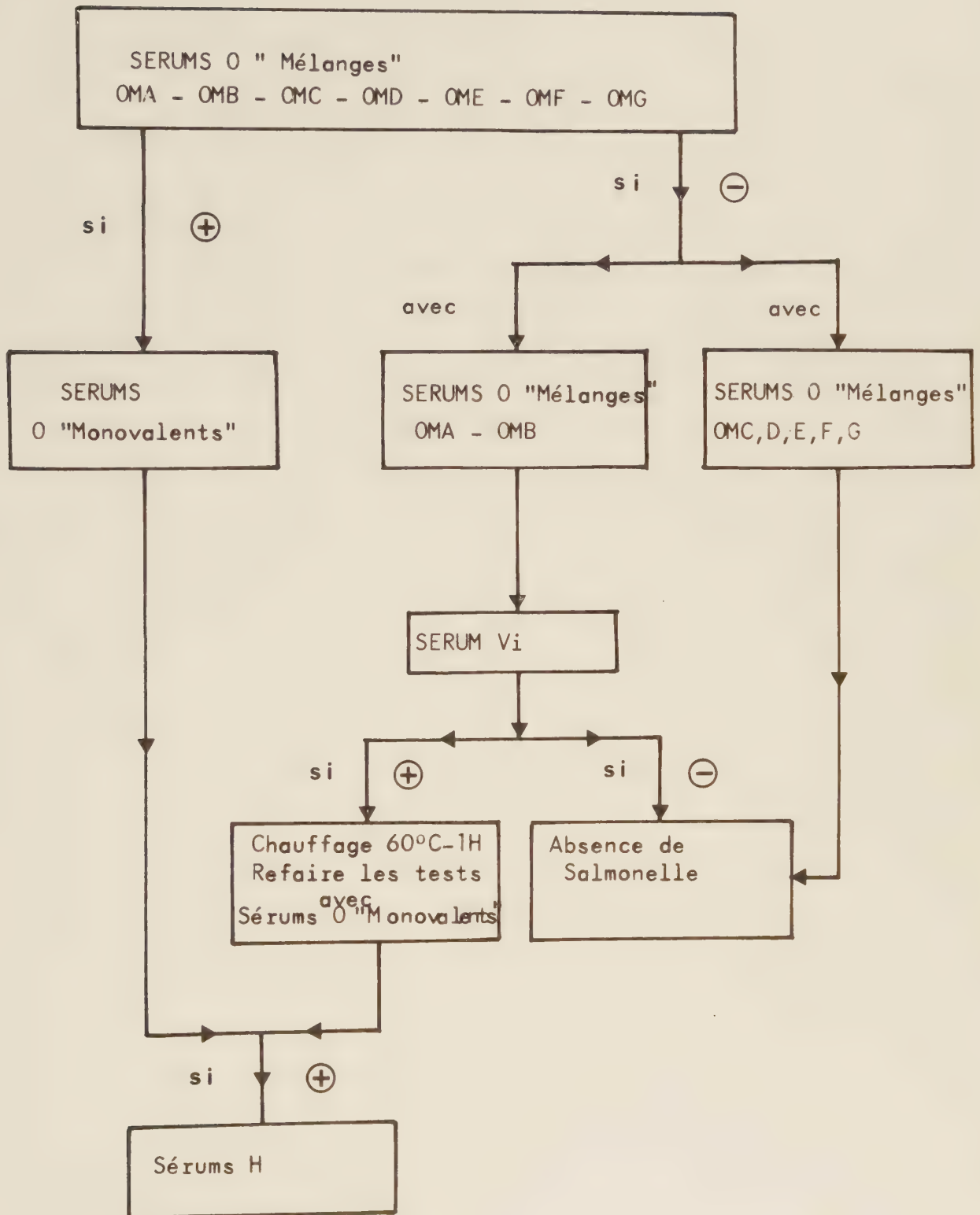
On vérifie l'absence d'agglutination : dans le cas contraire toute agglutination dans un quelconque sérum anti-Salmonella sera sans aucune valeur.

3.2.2.2. Détermination du groupe sérologique.

Si le contrôle précédent est négatif, on réalise une suspension semblable dans une goutte de sérum anti-Salmonella "O-mélange" (Institut Pasteur).

Le protocole d'analyse est schématisé dans la Fig. 2.

EMPLOI DES SERUMS O "Mélanges"



* test avec les sérums O.M.A. et O.M.B.
.....

Plus de 98 % des Salmonella rencontrées chez l'homme
et les animaux à sang chaud, possèdent un antigène somatique O,
correspondant aux agglutinines contenues dans les sérums
O.M.A. et O.M.B.

- Au cas où la réaction d'agglutination est positive, on passe
à un sérum de groupe que l'on choisit en fonction de la
fréquence habituelle des Salmonella dans la région (Tableau 1).

T A B L E A U I

S E R U M S O M E L A N G E S	G R O U P E S						
	A N T I G E N E S O M A T I Q U E						
O M A	A	B	D 1	D 2	E 1	E 4	L
	1, 2, 12	4, 5, 12	9, 12	9, 46	3, 10	1, 3, 19	21
O M B	C 1	C 4	C 2	C 3	F	G	H
	6, 7	6, 7, 14	6, 8	8, 20	11	13, 22	13, 23
O M C	I	J	K	M	N	O	P
	16	17	18	28	30	35	38
O M D	Q	R	S	T	U	V	W
	39	40	4	42	43	44	45
O M E	X	Y	Z	51	52	53	
	47	48	50	51	52	53	
O M F	54	55	56	57	58	59	
	54	55	56	57	58	59	
O M G	60	61	62	63	64	65	
	60	61	62	63	64	65	

- Si aucune agglutination n'est obtenue avec ces deux sérums polyvalents, on recherche la formation d'agglutinats avec le sérum Vi. Deux cas :

. La culture ne réagit pas avec le sérum anti-Salmonella Vi : celle-ci peut être considérée comme n'appartenant pas au genre Salmonella.

. La culture (S. typhi, S. paratyphi C, S. dublin) réagit avec le sérum Vi, alors qu'elle est inagglutinable par le sérum anti-O correspondant. On explique ce phénomène par le fait que certaines bactéries, riches en antigènes Vi, masquent l'antigène O (crypto-antigène), l'empêchant ainsi de réagir avec l'anticorps O correspondant, qui ne peut induire l'agglutination.

Pour rendre une telle suspension O agglutinable, on la porte au bain-marie à + 60° C pendant une heure, ou à l'ébullition pendant dix minutes. Sous l'action de la chaleur, l'antigène Vi passe dans le bouillon "démasquant" l'antigène O qui devient agglutinable.

* test avec les autres sérums "O-mélange".
.....

- Si une agglutination a lieu avec l'un de ces sérums, on détermine quel est le sérum O monovalent correspondant au mélange qui peut former une nouvelle agglutination.

- Si aucune agglutination n'est mise en évidence avec les sérums O.M.A., O.M.B., Vi, O.M.C., etc..., on peut conclure à l'absence de Salmonella.

3.2.2.3. Détermination du sérotype.

En se référant au schéma de KAUFFMAN-WHITE, on recherche les facteurs H correspondants au groupe O, déterminé précédemment, pour la Salmonella à étudier.

Suivant le sérotype, l'antigène est mono -, di -, tri -, ou quadriphasique dans des cas très rares. Il convient de déterminer les agglutinations avec les sérums correspondants aux phases 1 et 2 de ces sérotypes.

L'antigène H de certaines Salmonella peut se trouver sous deux phases présentant des spécificités entièrement différentes.

Parfois, ne pouvant pas mettre en évidence l'antigène de la phase 1 ou 2, il faut éliminer une phase pour favoriser le développement du germe dans l'autre phase. On procède à une inversion de phase, selon la méthode de SVEN GUARD (165).

3.3. Confirmation du typage.

Toutes les souches sont envoyées au Centre National des Salmonella, Laboratoire du Professeur LE MINOR, à l'Institut Pasteur de Paris.

Chaque envoi est accompagné d'un formulaire comportant deux feuillets dont l'un nous est retourné avec le diagnostic.

L'autre feuille conservée dans les archives du Centre sert à dresser une liste des Salmonella qui, chaque trimestre, est envoyée au Service d'Epidémiologie du Ministère de la Santé. Les lysotypages sont effectués par le Centre National de Lysotypie, Laboratoire du Docteur VIEU, à l'Institut Pasteur de Paris.

III. ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CROISSANCE
DES Salmonella ET DES COLIFORMES,
EN CULTURE PURE ET EN CULTURE MIXTE,
DANS LES BOUILLONS D'ENRICHISSEMENT
AU SELENITE ET AU TETRATHIONATE.

L'observation systématique de colonies confluentes dégradant le lactose sur le milieu HEKTOEN utilisé pour isoler les bactéries qui se sont développées sur milieu au sélénite - alors que ce phénomène, pour un même échantillon, ne se produit que très rarement après enrichissement sur milieu au tétrathionate - nous a incité à entreprendre l'étude de l'action du sélénite et du tétrathionate de sodium sur les différentes Salmonella et bactéries coliformes rencontrées dans les eaux usées.

1. MATERIEL.

1.1 Matériel de fermentation.

° Fermenteur.

Toutes nos cultures bactériennes ont été faites en fermenteur de 2 litres, modèle BIOLAFITTE.

Le corps du fermenteur est constitué d'une cuve en pyrex autoclavable, surmontée d'une platine équipée d'un mécanisme d'agitation et percée de quatre orifices obturables.

° Moteur d'agitation.
.....

La rotation de l'axe est assurée par un moteur d'agitation en liaison avec son réducteur de vitesse.

° pHmètre.
.....

Un des orifices de la platine du fermenteur est destiné à recevoir une sonde de pH, stérilisable à l'autoclave, modèle Ingold, double pont, qui est relié à un pHmètre industriel, modèle Tacussel, type PH IT/NX.

° Enregistreur.
.....

Cet amplificateur électronique de mesure est couplé avec un enregistreur par points, à double échelle, modèle LB, qui assure un contrôle continu du pH de la culture.

° Régulateur thermique.
.....

La température de la culture est obtenue en plaçant le fermenteur dans un bain-marie thermostaté, réglable de + 10° C à + 80° C.

1.2. Compteur de colonies.

Le comptage des colonies est assuré par un compteur de colonies semi-automatique du type Apelab.

1.3. Souches bactériennes.

Les souches :

- E. coli L.M.H. 79
- E. coli L.M.H. 2356
- E. coli O₁₂₇ B₈

- K. pneumoniae L.M.H. 5304
- K. pneumoniae A.T.C.C. 10031
- Enterobacter aerogenes L.M.H. 1352
- S. paratyphi B L.M.H. 2528
- S. typhi murium L.M.H. 8300
- S. brancaster L.M.H. 4603
- S. typhi L.M.H. 50

ont été sélectionnées à partir de notre banque de souches maintenue dans notre laboratoire.

La plupart des souches ont été isolées à partir d'eaux usées sauf E. coli O₁₂₇ B₈ et S. typhi L.M.H. 50, qui ont été mis en évidence à partir de ∞ procultures. K. pneumoniae, référencée 10031, provient de la collection de l'A.T.C.C.

1.4. Milieux de culture.

Les différentes souches bactériennes sont mises en culture dans du bouillon Coeur-Cerveille (Institut Pasteur) à + 37° C. Ces suspensions constituent l'inoculum de départ qui sert à ensemen- cer les différents milieux d'enrichissement.

1.4.1. Milieux pour la croissance des bactéries en culture pure.

* Milieux d'enrichissement.

Les bouillons d'enrichissement utilisés sont :

- le bouillon au tétrathionate (Difco) auquel on ajoute, au moment de l'emploi, une solution d'iode et d'iodure de potassium.

- le bouillon au sélénite (Difco), à simple et à double concentration.

* Milieux gélosés pour numération.
.....

Toutes les numérations sont effectuées en utilisant le milieu Tryptose agar (Difco) et la gélose blanche, répartis en tubes de 160 x 16 mm, à raison de 20 et 10 ml, respectivement.

1.4.2. Milieus pour la croissance des bactéries
en culture mixte.

* Milieux d'enrichissement.
.....

Les bouillons d'enrichissement sont les mêmes que précédemment. On utilise le milieu d'enrichissement au sélénite à la concentration simple.

* Milieux témoins de réactions biochimiques spécifiques
.....
aux bactéries étudiées.
.....

● Mélange bactérien : E. coli - S. brancaster.
.....

Le problème était de trouver un bouillon qui puisse, à la fois, mettre en évidence la présence d'indole chez E. coli et la formation d'H₂ S chez Salmonella. Nous avons été amené à adapter le milieu "eau peptonée" en lui ajoutant un indicateur de production d'hydrogène sulfuré (A 1).

Nous le dénommons, dans la suite de notre étude,
"eau peptonée avec indicateur d'H₂ S".

● Mélange bactérien : K. pneumoniae - S. brancaster.
.....

- Pour traduire la présence de K. pneumoniae nous avons utilisé un milieu à base de saccharose (A 2) puisque Salmonella n'utilise pas le saccharose. Nous lui attribuons le nom de "milieu saccharosé".
- La mise en évidence de S. brancaster est fondée sur la production d'H₂ S d'où l'utilisation du milieu précédent (A 1).

2. METHODES.

2.1. Obtention des courbes de croissance en culture pure.

2.1.1. Dans un bouillon d'enrichissement au tétrathionate.

Dans un fermenteur contenant un litre de bouillon d'enrichissement, agité mécaniquement, maintenu à + 43 ° C, on ajoute 20 ml d'une solution d'iode et d'iodure de potassium. Après dix minutes de contact, à partir d'une culture d'Enterobacteries se trouvant en phase exponentielle de croissance (18 heures, + 37° C), onensemence le milieu avec 1 ml : la concentration en bactéries dans le fermenteur est d'environ 10⁶/ml.

Cinq minutes plus tard, après homogénéisation de la culture on effectue aseptiquement le premier prélèvement correspondant au temps T_1 .

Toutes les heures et demie, on recommence un nouveau prélèvement, correspondant respectivement au temps T_2 , T_3 ... T_{12} .

La durée de la manipulation s'étend sur une période de 16 h 30. A chaque prélèvement, un dénombrement est fait à partir de 1 ml de culture diluée jusqu'à 10^{-7} . Le milieu utilisé est la Tryptose agar. Après solidification du milieu, une couche de gélose blanche est coulée de façon à éviter l'envahissement du milieu par des colonies trop mobiles. Après une incubation pendant 24 heures à + 37° C, on dénombre toutes les colonies au compteur de colonies.

2.1.2. Dans un bouillon d'enrichissement au sélénite.

La méthode est la même que précédemment. Toutes les cultures dans le fermenteur sont maintenues à la température de + 43° C.

2.1.3. Cas de *S. typhi*.

Seule la croissance de *S. typhi* a été suivie à la température de + 37° C dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate et au sélénite, à simple et à double concentration, pendant une période de 27 h 30. L'inoculum, qui sert à ensemercer le fermenteur, titre au départ environ 10^3 /ml.

2.2. Obtention des courbes de croissance en culture mixte.

2.2.1. Mélange : *E. coli* L.M.H. 79 - *S. brancaster* L.M.H.4603.

La méthode retenue pour effectuer les numérations respectives d' *E. coli* et *S. brancaster*, aux différents temps de prélèvement,

est celle du nombre le plus probable (N.P.P.) (A 3)

2.2.1.1. Sensibilité de la méthode.

==.==.==.==.==.==.==.==.==.==

Nous avons voulu tester si le milieu, élaboré par nos soins, correspondait aux besoins attendus.

Pour cela, deux types de mélanges ont été effectués :

- mélange 1 :

- . E. coli, à la concentration de $3,9.10^6$ /ml,
- . S. brancaster, à la concentration de $4,8.10^2$ /ml.

- mélange 2 :

- . E. coli, à la concentration de $3,9.10^2$ /ml,
- . S. brancaster, à la concentration de $4,8.10^6$ /ml.

Ceux-ci ont été réalisés de la manière suivante : à partir de deux suspensions bactériennes, en eau physiologique, provenant de deux cultures de 18 heures sur milieu gélosé incliné (Brain Heart Infusion Agar-Difco-), on inocule un tube 160 x 16 mm, contenant 8 ml de tryptone-sel, avec 1 ml des dilutions de chacune des suspensions (10^{-2} et 10^{-6} pour le mélange 1, 10^{-6} et 10^{-2} pour le mélange 2).

Parallèlement, la numération de ces mêmes suspensions nous donne les concentrations initiales, soit pour :

- E. coli L.M.H. 79, $3,9.10^9$ /ml,
- S. brancaster L.M.H. 4603, $4,8.10^9$ /ml.

Pour chacun des deux mélanges, on introduit en triple, dans des tubes 160 x 16 mm contenant 9 ml de "milieu peptoné avec indicateur d' H_2S ", 1 ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} .

L'observation des cultures est faite après une incubation à + 37° C pendant 48 heures :

- La présence d'E. coli est déterminée par la mise en évidence de l'indole au moyen du réactif de KOVACS.
- La présence de S. brancaster est fondée sur l'apparition d'un noircissement plus ou moins intense du milieu.

2.2.1.2. Croissance du mélange bactérien dans

==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.

un milieu d'enrichissement.

==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.==.

- * Dans les proportions respectives 10^6 /ml E. coli
et 10^2 /ml S. brancaster.

A partir de deux bouillons de culture de 18 heures d'E. coli, titrant $1,85.10^9$ /ml et de S. brancaster titrant $1,52.10^9$ /ml, on ensemence dans un litre de milieu d'enrichissement au tétrathionate et au sélénite, respectivement 1 ml de culture pure d'E. coli et 1 ml de la dilution 10^{-4} de la culture de S. brancaster.

Les concentrations, obtenues au temps T_1 , par ml de milieu, sont donc :

- $1,85.10^6$ pour E. coli L.M.H. 79,
- $1,52.10^2$ pour S. brancaster L.M.H. 4603.

Les prélèvements ont lieu toutes les heures et demie. La croissance est suivie pendant 16 h 30.

A chaque prélèvement, on inocule en triple, dans des tubes de 160 x 16 mm, contenant 9 ml de milieu "eau peptonée avec indicateur d'H₂ S", 1 ml du milieu d'enrichissement et 1 ml des dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 10⁻¹⁰.

La lecture des tubes est observée après 48 heures d'incubation à + 37° C.

* Dans les proportions respectives 10⁶/ml E. coli,
et 1/ml S. brancaster.

Les concentrations, obtenues au temps T₁, par ml de milieu, sont:

- dans le milieu au sélénite :
 - . 9,1.10⁵ pour E. coli L.M.H. 79,
 - . 1 pour S. brancaster L.M.H. 4603.
- dans le milieu au tétrathionate :
 - . 1,28.10⁶ pour E. coli L.M.H. 79,
 - . 1,24 pour S. brancaster L.M.H. 4603.

2.2.2. Mélange:K. pneumoniae A.T.C.C. 10031 -
S. brancaster L.M.H. 4603.

2.2.2.1. Sensibilité de la méthode.
=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.

Il ne nous a pas été possible de réaliser un seul milieu capable de différencier biochimiquement, à la fois K. pneumoniae et S. brancaster.

Donc, par la méthode du N.P.P., pour un même prélèvement nous utilisons deux milieux, l'un permettant de dénombrer K.pneumoniae l'autre S. brancaster, conformément à ce que nous avons exposé en III - 1 - 4 - 2.

On part de deux suspensions bactériennes, titrant respectivement :

- $8,6.10^8$ /ml pour K. pneumoniae,
- $9,4.10^8$ /ml pour S. brancaster,

et par dilutions adéquates on obtient des suspensions bactériennes permettant un mélange de souches dans les proportions :

- $8,6.10^3$ /ml pour K. pneumoniae,
- $9,4.10^7$ /ml pour S. brancaster,

2.2.2.2. Croissance du mélange bactérien dans
 =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =.
 un milieu d'enrichissement.
 =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =. =.

* Dans les proportions respectives 10^6 /ml K. pneumoniae
 et 10^2 /ml S. brancaster.

● Pour un litre de milieu au sélénite, les concentrations du mélange au temps T_1 , sont les suivantes :

- pour K. pneumoniae $7,8.10^5$ /ml (1 ml de culture à $7,8.10^8$ /ml),
- pour S. brancaster $5,1.10^1$ /ml (1 ml de la dilution 10^{-4} d'une culture à $5,1.10^8$ /ml).

● Pour un litre de milieu au tétrathionate, les concentrations du mélange, à l'origine de la courbe (T_1), sont :

- pour K. pneumoniae $8,9.10^5$ /ml,
- pour S. brancaster $1,27.10^2$ /ml.

TABLEAU II

Numération en fonction du temps de K. pneumoniae.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

HEURE de PRELEVEMENT	SOUCHES			
	<u>K. pneumoniae</u> A.T.C.C. 10031		<u>K. pneumoniae</u> L.M.H. 5304	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,02.10 ⁶	6,00	9,20.10 ⁵	5,96
T ₂	8,00.10 ⁵	5,90	8,70.10 ⁵	5,94
T ₃	1,81.10 ⁵	5,26	7,90.10 ⁴	4,90
T ₄	7,50.10 ⁴	4,87	4,60.10 ³	3,66
T ₅	4,30.10 ⁴	4,63	1,36.10 ³	3,13
T ₆	1,83.10 ⁴	4,26	1,02.10 ³	3,01
T ₇	1,19.10 ⁴	4,08	5,30.10 ³	3,72
T ₈	9,80.10 ³	3,99	6,00.10 ²	2,78
T ₉	9,30.10 ³	3,97	1,39.10 ³	3,14
T ₁₀	6,00.10 ⁴	4,78	2,20.10 ³	3,34
T ₁₁	3,69.10 ⁴	4,57	5,90.10 ³	3,77
T ₁₂	8,30.10 ⁴	4,92	1,11.10 ⁴	4,04

N= Nombre de bactéries /ml.

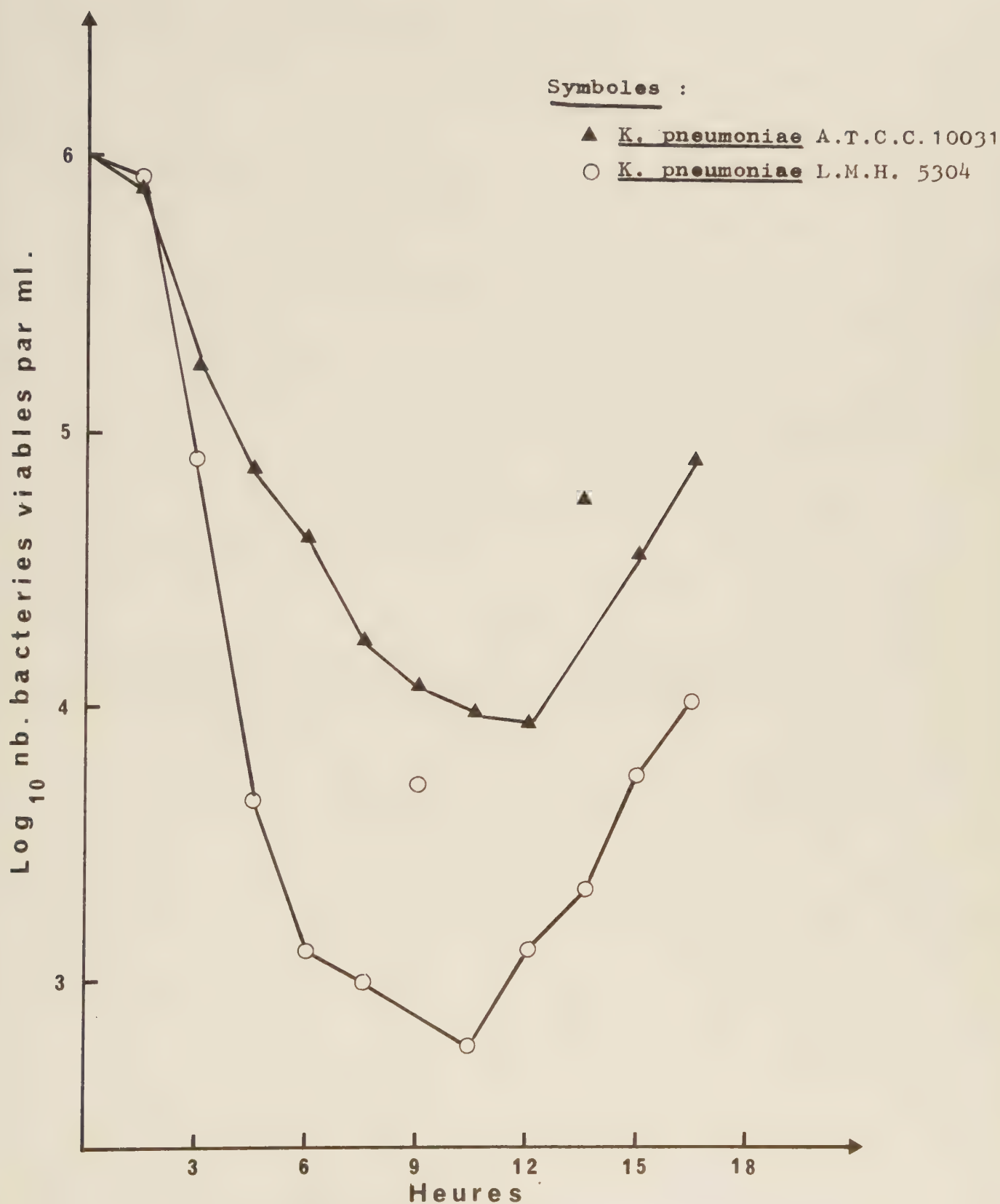


Fig.: 3 - Courbes de croissance de K. pneumoniae dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate incubé à + 43° C.

Quelle que soit la souche testée, après 18 heures d'incubation à + 43° C, la concentration en bactéries est inférieure à celle du départ.

● Enterobacter aerogenes

L'inhibition de croissance constatée dans les premières heures de culture chez K. pneumoniae est moins marquée chez E. aerogenes. Les résultats consignés dans le Tableau III et leur représentation graphique Fig. 4 montrent que le nombre de bactéries, en 12 heures, baisse seulement d'une puissance de 10 (10⁶/ml à 10⁵/ml).

Après 18 heures de culture, on retrouve le même nombre d'E. aerogenes qu'au départ.

TABLEAU III

Numération en fonction du temps d'Enterobacter aerogenes .
 - Action du tétrathionate après incubation à + 43° C .
 - Dénombrement après incubation à + 37° C .

Souche : <u>Enterobacter aerogenes</u> L.M.H. 1352					
Heure de Prélèvement	N	Log ₁₀ N	Heure de Prélèvement	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,62.10 ⁶	6,21	T ₇	1,47.10 ⁵	5,17
T ₂	1,37.10 ⁶	6,14	T ₈	9,50.10 ⁴	4,98
T ₃	6,90.10 ⁵	5,84	T ₉	9,70.10 ⁵	5,99
T ₄	5,10.10 ⁵	5,71	T ₁₀	1,42.10 ⁵	5,15
T ₅	2,37.10 ⁵	5,37	T ₁₁	2,60.10 ⁵	5,41
T ₆	2,17.10 ⁵	5,34	T ₁₂	1,30.10 ⁶	6,11

N = Nombre de bactéries/ml.



Fig.: 4 - Courbe de croissance d'Enterobacter aerogenes L.M.H. 1352 dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate, incubé à + 43° C.

● E. coli

Les courbes de croissance Fig. 5, tirées à partir des données consignées dans le Tableau IV, mettent en évidence deux points particuliers :

- le déclin rapide, durant les 6 premières heures d'incubation, du nombre d'E. coli. Celui-ci, passant de 10^6 germes/ml à 10^2 germes/ml.

- l'effet bactéricide du mélange tétrathionate-thiosulfate sur la croissance d'E. coli O₁₂₇ B₈.

L'inhibition de croissance est limitée dans le temps. Au delà d'un temps d'action de quelques heures, la reprise de croissance, selon la souche utilisée, peut être importante et même peut dépasser la concentration de départ.

3.1.1.1.2. Action du sélénite de sodium. oooooooooooooooooooooooooooo

Le pH est remarquablement stable. L'écart moyen est de 0,2 unité pH.

● K. pneumoniae

La croissance de K. pneumoniae dans le sélénite est représentée par la Fig. 6.

L'inhibition de croissance, mise en évidence durant les premières heures dans le bouillon d'enrichissement au tétrathionate, n'est pas confirmée dans ce milieu.

Il y a un enrichissement moyen du nombre de bactéries, de l'ordre de 10^2 /ml. Les résultats du Tableau V illustrent ce fait.

TABLEAU IV

Numération en fonction du temps d'E.coli.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

HEURE de PRELEVEMENT	SOUCHES					
	<u>E. coli</u> L.M.H. 2356		<u>E. coli</u> 0127 B8		<u>E. coli</u> L.M.H. 79	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,47.10 ⁶	6,17	1,94.10 ⁶	6,29	2,70.10 ⁶	6,43
T ₂	5,40.10 ³	3,73	8,10.10 ⁴	4,91	4,40.10 ⁴	4,64
T ₃	7,50.10 ²	2,87	4,20.10 ³	3,62	4,70.10 ³	3,67
T ₄	1,10.10 ²	2,04	9,00.10 ²	2,95	1,60.10 ³	3,20
T ₅	7,10.10 ²	2,85	6,00.10 ²	2,78	1,00.10 ³	3,00
T ₆	1,60.10 ²	2,20	0	-	6,30.10 ²	2,80
T ₇	3,00.10 ²	2,48	0	-	8,00.10 ²	2,90
T ₈	3,80.10 ³	3,58	0	-	6,30.10 ³	3,80
T ₉	6,70.10 ³	3,83	0	-	6,00.10 ²	2,78
T ₁₀	6,60.10 ⁴	4,82	0	-	3,80.10 ³	3,58
T ₁₁	2,94.10 ⁵	5,47	0	-	1,60.10 ³	3,20
T ₁₂	3,14.10 ⁶	6,50	0	-	2,20.10 ⁴	4,34

N = Nombre de bactéries/ml.

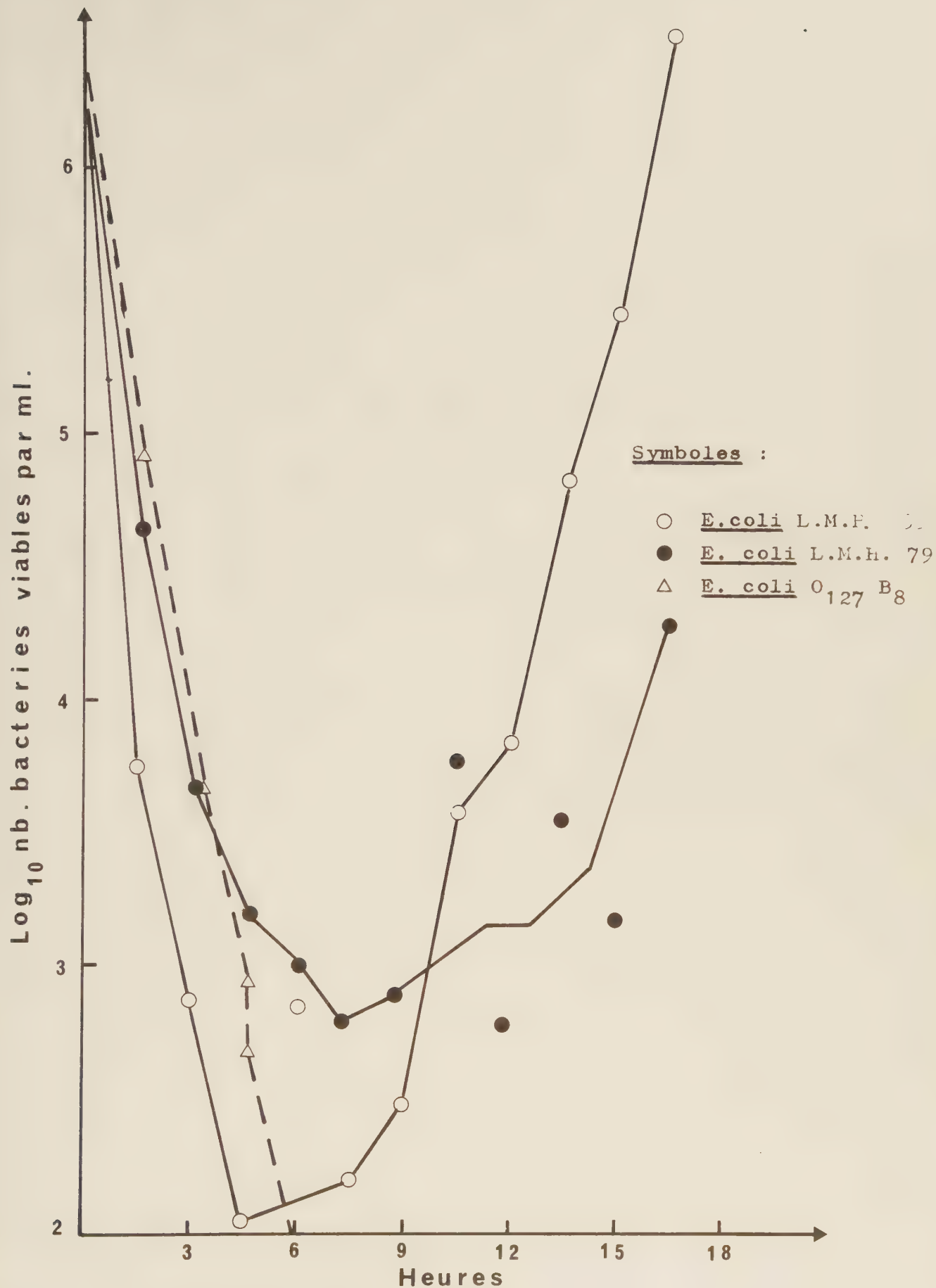


Fig.: 5 - Courbes de croissance d' E. coli dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate incubé à + 43° C.

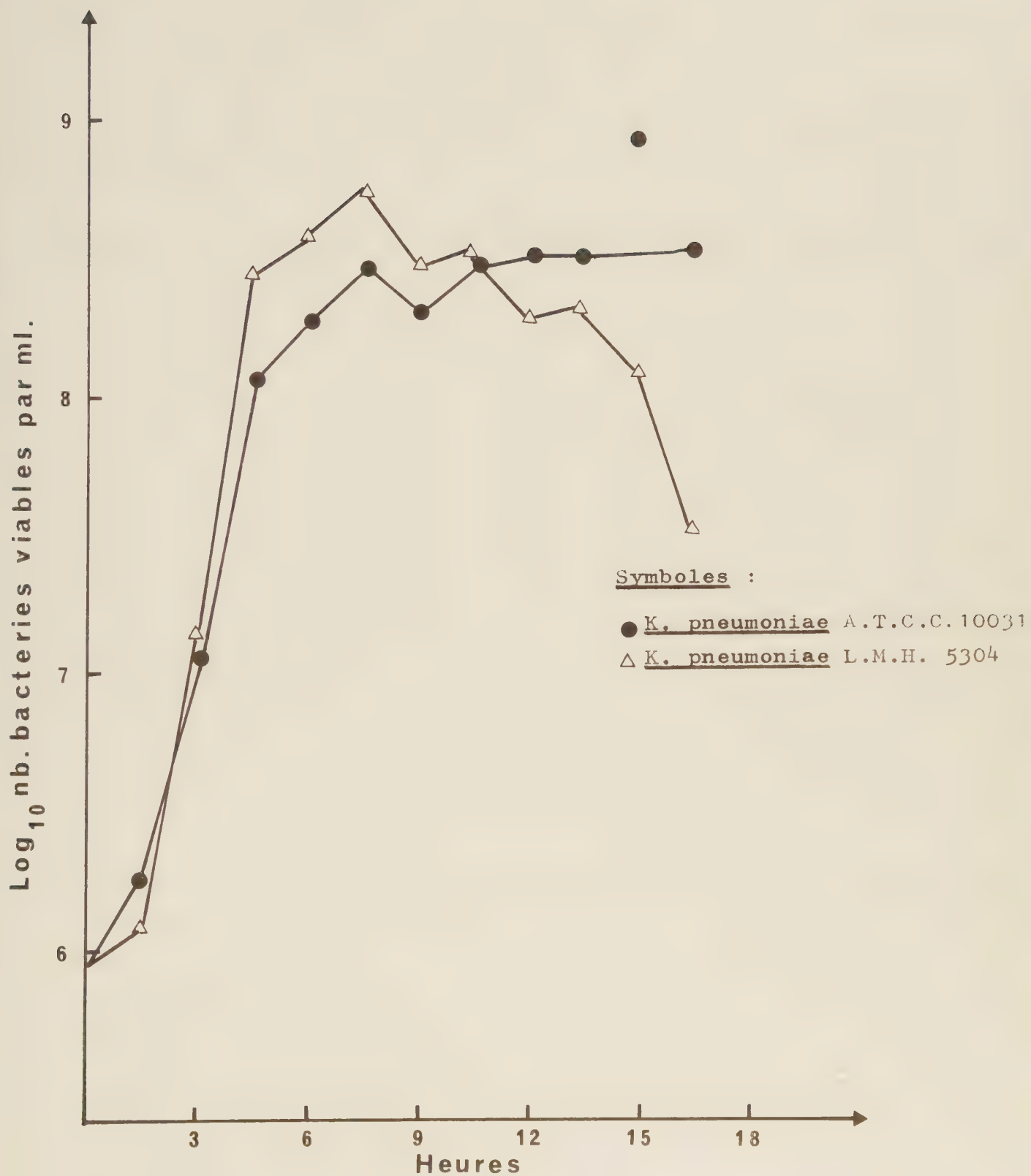


Fig. : 6 - Courbes de croissance de K. pneumoniae dans un milieu d'enrichissement au sélénite, incubé à + 43° C.

TABLEAU V

Numération en fonction du temps de K. pneumoniae.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Heure de PRELEVEMENT	SOUCHES			
	<u>K. pneumoniae</u> A.T.C.C. 10031		<u>K. pneumoniae</u> L.M.H. 5504	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	9,00.10 ⁵	5,95	9,00.10 ⁵	5,95
T ₂	1,81.10 ⁶	6,26	1,27.10 ⁶	6,10
T ₃	1,10.10 ⁷	7,04	1,38.10 ⁷	7,14
T ₄	1,17.10 ⁸	8,07	3,00.10 ⁸	8,48
T ₅	1,90.10 ⁸	8,28	4,00.10 ⁸	8,60
T ₆	2,98.10 ⁸	8,47	5,80.10 ⁸	8,76
T ₇	2,09.10 ⁸	8,32	3,20.10 ⁸	8,50
T ₈	3,24.10 ⁸	8,51	3,50.10 ⁸	8,54
T ₉	3,41.10 ⁸	8,53	2,01.10 ⁸	8,30
T ₁₀	3,42.10 ⁸	8,53	2,20.10 ⁸	8,34
T ₁₁	9,00.10 ⁸	8,95	1,30.10 ⁸	8,11
T ₁₂	3,60.10 ⁸	8,56	3,50.10 ⁷	7,54

N = Nombre de bactéries/ml.

● E. aerogenes.

Le tableau VI et la représentation graphique des résultats Fig. 7 font ressortir qu'aucune inhibition ne se produit sur la croissance de cette bactérie coliforme.

Au contraire, le nombre de bactéries en fin de culture est multiplié par un facteur de 1000 par rapport à la concentration de départ.

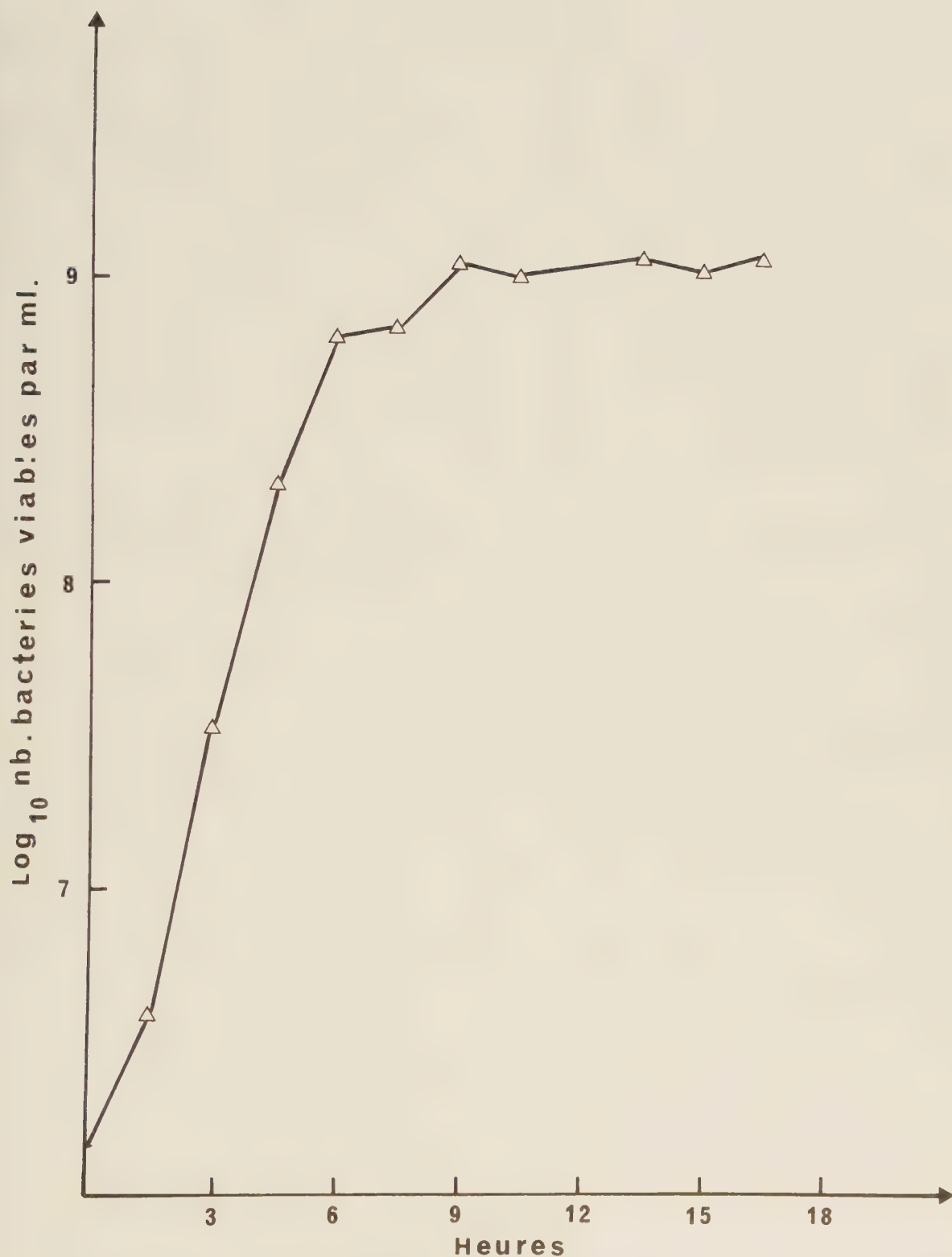


Fig.: 7 - Courbe de croissance d'*Enterobacter aerogenes*
L.M.H. 1352 dans un milieu d'enrichissement au
sélénite, incubé à + 43° C.

Numération en fonction du temps d'E. aerogenes.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Souche : Enterobacter aerogenes L.M.H. 1352

Heure de Prélèvement	N	Log ₁₀ N	Heure de Prélèvement	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,46.10 ⁶	6,16	T ₇	1,15.10 ⁹	2,06
T ₂	3,82.10 ⁶	6,58	T ₈	1,05.10 ⁹	2,02
T ₃	3,30.10 ⁷	7,52	T ₉	-	-
T ₄	2,10.10 ⁸	8,32	T ₁₀	1,21.10 ⁹	2,08
T ₅	6,50.10 ⁸	8,81	T ₁₁	1,12.10 ⁹	2,05
T ₆	7,00.10 ⁸	8,84	T ₁₂	1,22.10 ⁹	2,09

N = Nombre de bactéries/ml.

● E. coli.

Les courbes de croissance représentées par la Fig. 8, obtenues à partir des résultats portés dans le Tableau VII présentent une allure caractéristique avec un maximum et un minimum.

Le milieu de culture, pendant les 3 premières heures d'incubation, favorise la croissance d'E. coli.

La chute du nombre de bactéries, que l'on constate 6 h. après, incite à effectuer un isolement entre 8 h et 10 h après mise en culture. Une incubation prolongée est sans avantage, puisqu'il y a un enrichissement de l'ordre de 100 bactéries/ml en E. coli O₁₂₇ B₈, par exemple.

TABLEAU VII

Numération en fonction du temps d'E. coli.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.

- Dénombrement après incubation à + 37° C.

HEURE de PRELEVEMENT	SOUCHES					
	<u>E. coli</u> L.M.H. 2356		<u>E. coli</u> O127 B8		<u>E. coli</u> L.M.H. 79	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,33.10 ⁶	6,12	2,04.10 ⁶	6,31	2,17.10 ⁶	6,34
T ₂	3,21.10 ⁶	6,50	7,40.10 ⁶	6,87	4,20.10 ⁶	6,62
T ₃	5,90.10 ⁶	6,77	3,80.10 ⁷	7,58	4,60.10 ⁷	7,66
T ₄	1,47.10 ⁶	6,17	1,26.10 ⁷	7,10	3,50.10 ⁷	7,54
T ₅	2,20.10 ⁵	5,34	1,81.10 ⁶	6,26	8,40.10 ⁵	5,92
T ₆	1,70.10 ⁵	5,23	-	-	5,40.10 ⁵	5,73
T ₇	8,50.10 ⁵	5,93	9,40.10 ⁴	4,97	7,30.10 ⁴	4,86
T ₈	1,05.10 ⁷	7,02	1,52.10 ⁴	4,18	2,30.10 ⁴	4,36
T ₉	3,49.10 ⁷	7,54	3,50.10 ⁴	4,54	5,30.10 ⁴	4,72
T ₁₀	4,45.10 ⁷	7,65	8,10.10 ⁴	4,91	5,70.10 ⁵	5,76
T ₁₁	7,90.10 ⁷	7,90	9,50.10 ⁵	5,98	6,60.10 ⁶	6,82
T ₁₂	8,40.10 ⁷	7,92	1,33.10 ⁷	7,12	2,20.10 ⁷	7,34

N = Nombre de bactéries/ ml.

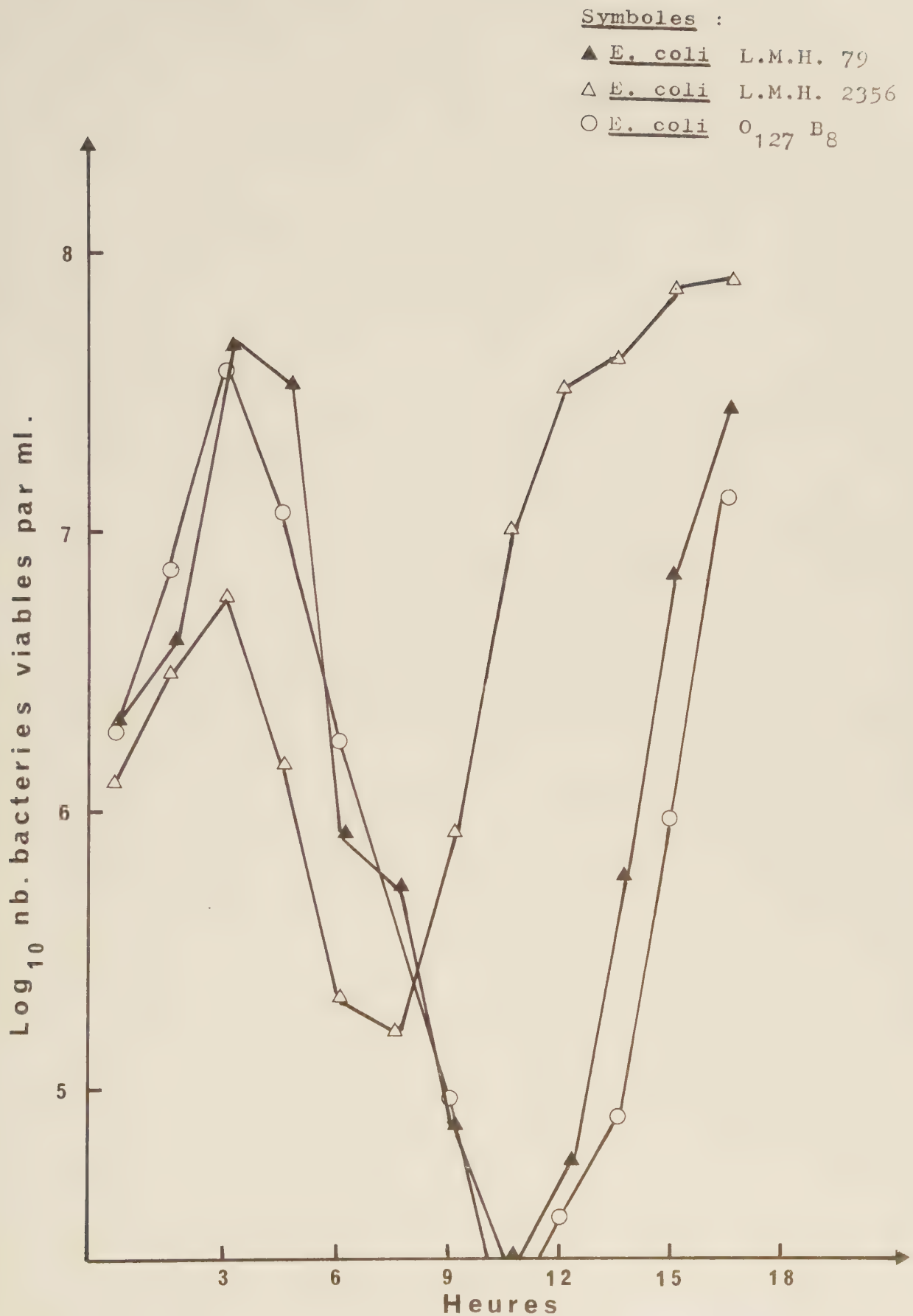


Fig.: 8 - Courbes de croissance d'E. coli dans un milieu d'enrichissement au sélénite, incubé à + 43° C.

3.1.1.2. Sur les Salmonella.
=. =. =. =.

3.1.1.2.1. Action du tétrathionate de sodium.
oooooooooooooooooooooooooooooooooooo

Le Tableau VIII et la Fig. 9, qui rendent compte des résultats, mettent en évidence des courbes de croissance de type classique. L'action du mélange tétrathionate - thiosulfate de sodium sur les différentes souches est très variable : on constate une inhibition de croissance plus marquée pour S. paratyphi B que pour S. brancaster et S. typhi murium.

3.1.1.2.2. Action du sélénite de sodium.
oooooooooooooooooooooooooooooooooooo

L'inhibition de croissance mise en relief pour l'un des sérotypes après passage dans le milieu d'enrichissement au tétrathionate n'est plus démontrée dans le milieu au sélénite. Le Tableau IX et la Fig. 10 qui représentent les résultats obtenus montrent, qu'après 18 heures de culture à + 43° C, les concentrations finales en Salmonella sont très voisines.

TABLEAU VIII

Numération en fonction du temps de différents sérotypes de Salmonella.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.

- Dénombrement après incubation à + 37° C.

HEURE de PRELEVEMENT	SOUCHES					
	<u>S. brancaster</u> L.M.H. 4603		<u>S. typhi murium</u> L.M.H. 8300		<u>S. paratyphi</u> L.M.H. 2528	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	9,50.10 ⁵	5,98	1,08.10 ⁶	6,03	1,20.10 ⁶	6,08
T ₂	1,05.10 ⁶	6,02	1,60.10 ⁶	6,20	1,06.10 ⁶	6,03
T ₃	1,04.10 ⁶	6,48	8,40.10 ⁶	6,92	9,60.10 ⁵	5,98
T ₄	4,40.10 ⁷	7,64	3,90.10 ⁷	7,59	2,33.10 ⁶	6,37
T ₅	1,81.10 ⁸	8,26	6,90.10 ⁷	7,84	1,15.10 ⁷	7,06
T ₆	1,71.10 ⁸	8,23	6,30.10 ⁷	7,80	1,45.10 ⁷	7,16
T ₇	3,18.10 ⁸	8,50	6,80.10 ⁷	7,83	8,20.10 ⁶	6,91
T ₈	2,07.10 ⁸	8,32	8,80.10 ⁷	7,94	1,51.10 ⁷	7,12
T ₉	2,49.10 ⁸	8,40	7,30.10 ⁷	7,86	1,59.10 ⁷	7,20
T ₁₀	5,80.10 ⁸	8,76	8,90.10 ⁷	7,95	2,90.10 ⁶	6,46
T ₁₁	2,75.10 ⁸	8,44	8,60.10 ⁷	7,93	1,22.10 ⁷	7,09
T ₁₂	2,15.10 ⁸	8,33	9,40.10 ⁷	7,97	1,57.10 ⁷	7,20

N = Nombre de bactéries/ml.

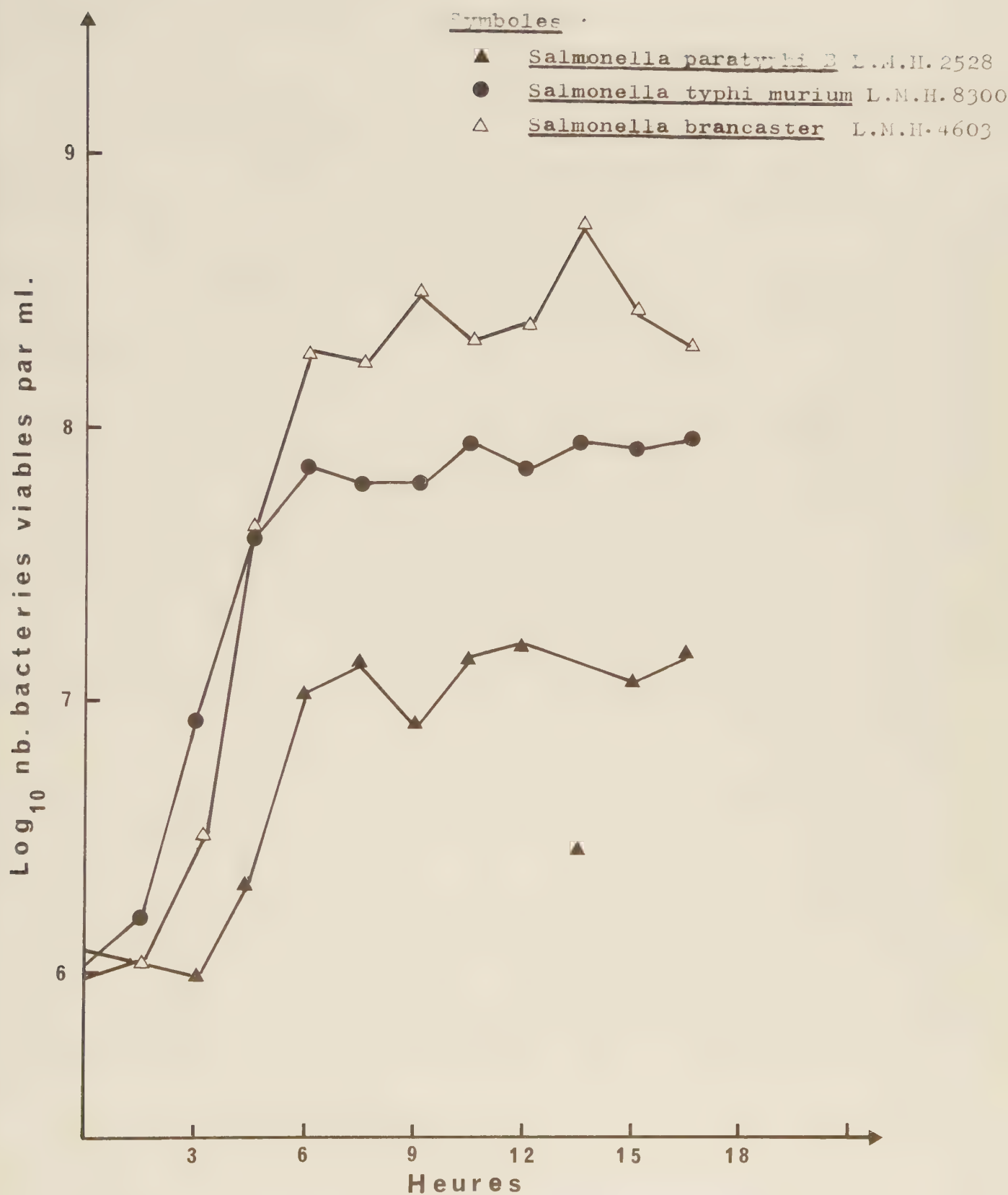


Fig.: 9 - Courbes de croissance de Salmonella dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate, incubé à + 43° C.

TABLEAU IX

Numération en fonction du temps de différents sérotypes de Salmonella.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

HEURE de PRELEVEMENT	SOUCHES					
	<u>S. brancaster</u> L.M.H. 4603		<u>S. typhi murium</u> L.M.H. 8300		<u>S. paratyphi</u> L.M.H. 2528	
	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N	N	Log ₁₀ N
T ₁	1,15.10 ⁶	6,06	8,20.10 ⁵	5,91	1,23.10 ⁶	6,09
T ₂	1,26.10 ⁶	6,10	1,10.10 ⁶	6,04	3,42.10 ⁶	6,53
T ₃	1,96.10 ⁷	7,29	6,60.10 ⁷	7,82	2,36.10 ⁶	7,37
T ₄	2,16.10 ⁸	8,33	1,65.10 ⁸	8,22	6,60.10 ⁷	7,82
T ₅	2,78.10 ⁸	8,44	3,60.10 ⁸	8,56	1,27.10 ⁸	8,10
T ₆	3,97.10 ⁸	8,60	3,40.10 ⁸	8,53	1,51.10 ⁸	8,18
T ₇	3,10.10 ⁸	8,49	4,70.10 ⁸	8,67	1,56.10 ⁸	8,19
T ₈	2,01.10 ⁸	8,30	4,70.10 ⁸	8,67	2,24.10 ⁸	8,35
T ₉	1,88.10 ⁸	8,27	-	-	1,98.10 ⁸	8,30
T ₁₀	2,79.10 ⁸	8,45	5,70.10 ⁸	8,76	1,72.10 ⁸	8,24
T ₁₁	2,27.10 ⁸	8,36	5,40.10 ⁸	8,73	2,06.10 ⁸	8,31
T ₁₂	1,28.10 ⁸	8,11	3,10.10 ⁸	8,49	2,13.10 ⁸	8,33

N = Nombre de bactéries/ ml.

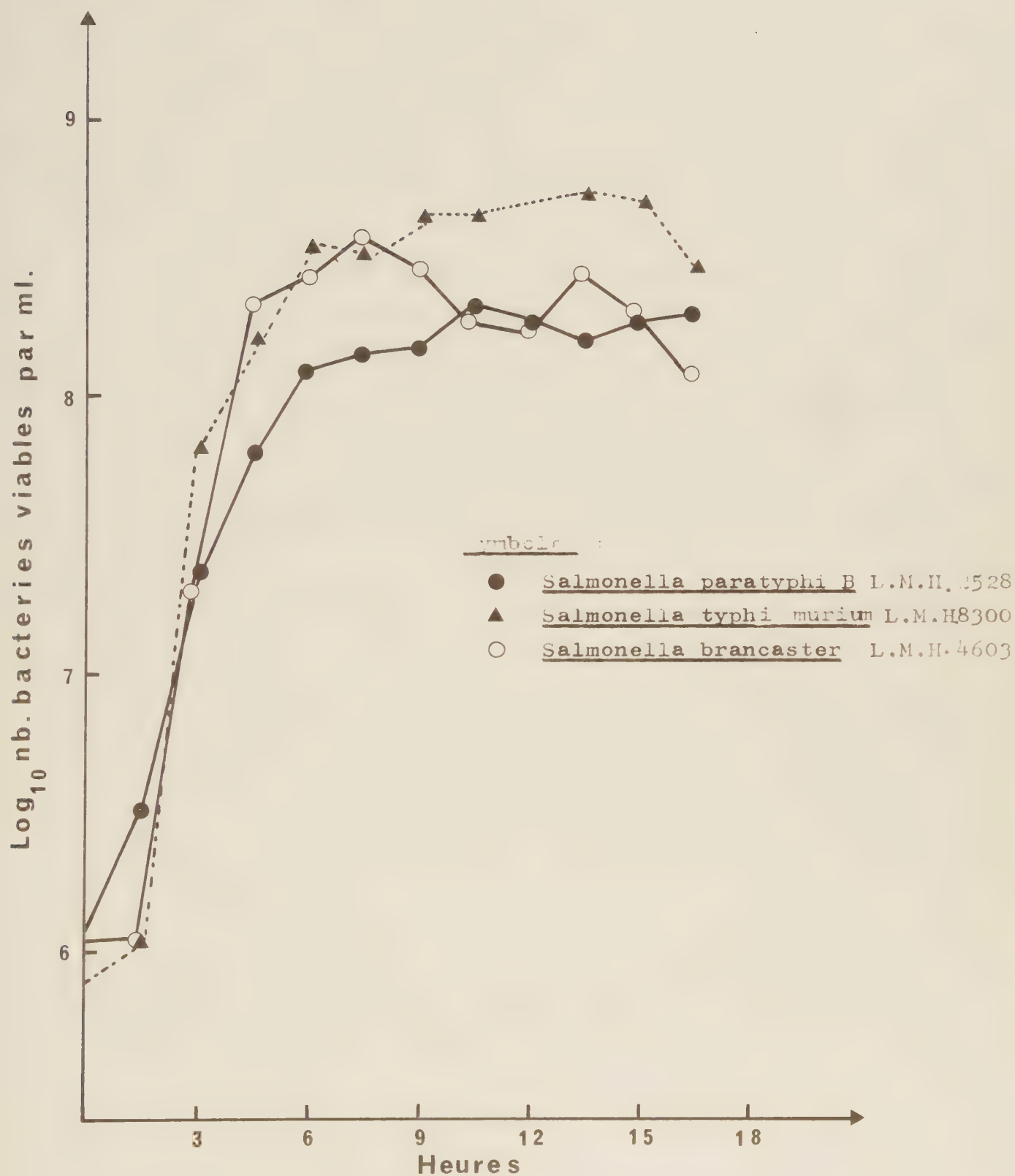


Fig.: 10 - Courbes de croissance de Salmonella dans un milieu d'enrichissement au sélénite, incubé à + 43° C.

3.1.1.3. Comparaison des courbes de croissance. =.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=

La superposition des courbes de croissance, sur une même représentation graphique (Fig. 11 et Fig. 12) met en relief les différences fondamentales entre les deux milieux d'enrichissement :

- l'écart maximum du nombre de bactéries, entre deux courbes de croissance extrêmes, dans les premières heures d'incubation, est d'environ 10^7 /ml pour le milieu au tétrathionate, alors qu'il est environ de 10^5 /ml pour le milieu au sélénite.
- le mode d'action du milieu au tétrathionate sur les coliformes et les Salmonella, est très différent de celui au sélénite.

On observe :

. une inhibition de croissance pour tous les coliformes dans les premières heures de culture,

. une croissance, plus ou moins normale, pour les Salmonella.
 La seule inhibition marquée dans le milieu au sélénite est celle qui affecte la croissance d'E. coli. On note une confusion dans les courbes de croissance entre les coliformes autres que E.coli et les Salmonella.

- La durée d'incubation optimale à $+43^{\circ}$ C pour obtenir les Salmonella sans les coliformes, semble se situer dans la tranche horaire 6 - 12 heures.

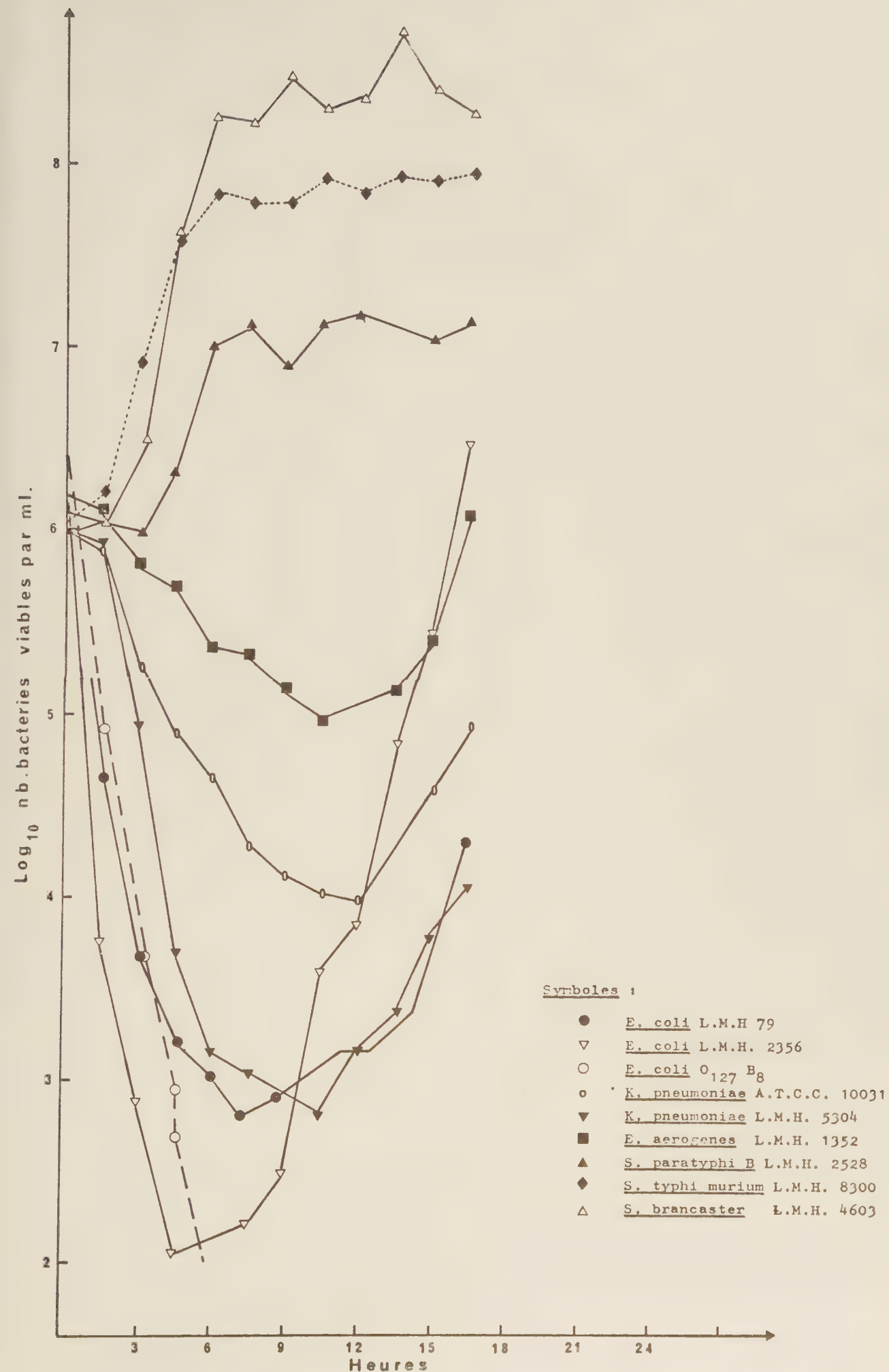


Fig. 11 - Comparaison des courbes de croissance de différentes bactéries dans un milieu d'enrichissement au tétrathionate incubé à + 43° C.

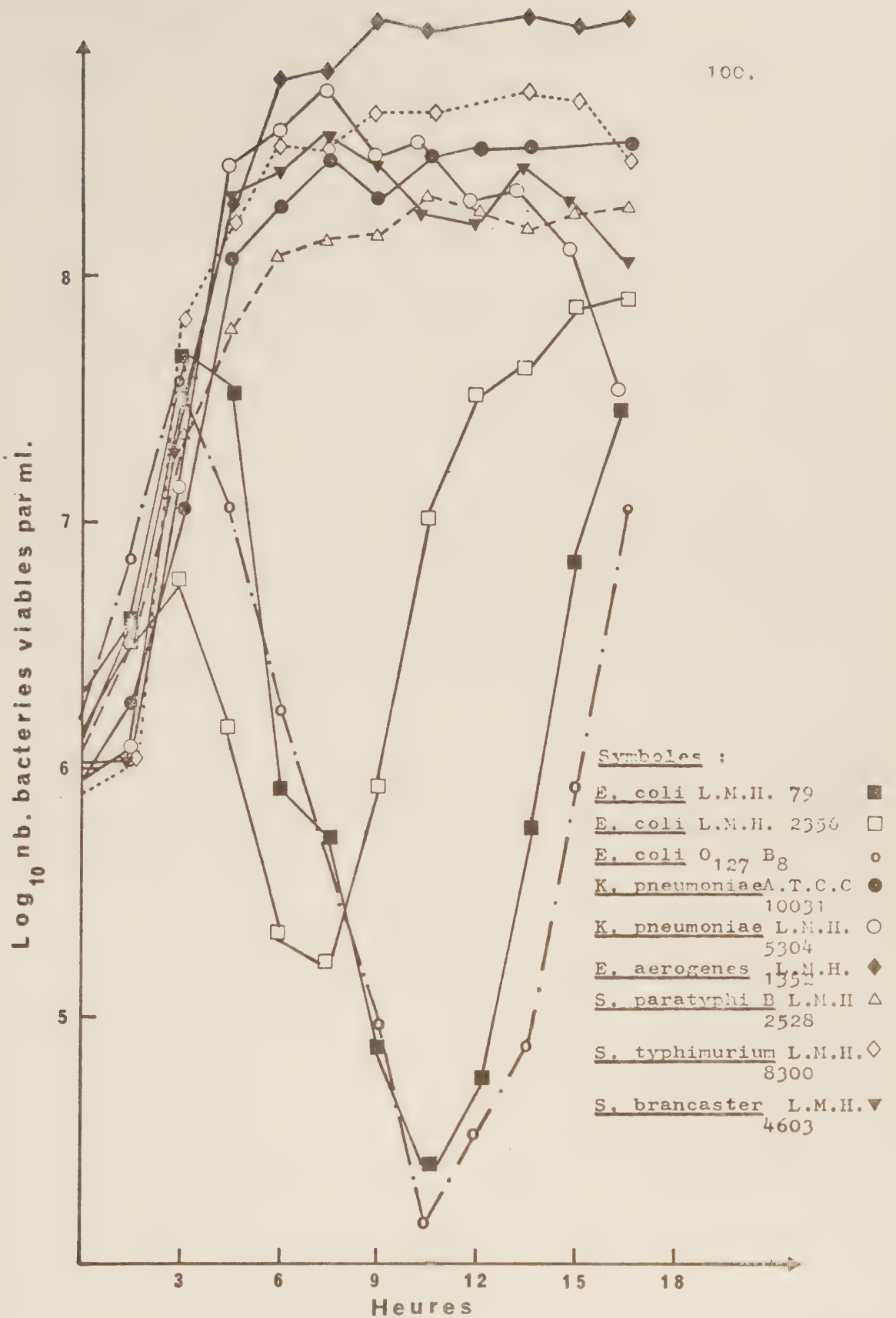


FIG.: 12 - Comparaison des courbes de croissance de différentes bactéries dans un milieu d'enrichissement au sélénit incubé à + 43° C.

3.1.2. Cas de Salmonella typhi.

La croissance de S. typhi à + 37° C dans un milieu d'enrichissement est différente, selon qu'il s'agit d'un bouillon au sélénite ou au tétrathionate.

Le Tableau X et la Fig. 13 qui représentent les résultats obtenus, montrent un développement normal de S. typhi dans le milieu au sélénite, tandis que nous observons une inhibition de croissance dans le milieu au tétrathionate.

Le milieu d'enrichissement au sélénite, à double concentration, n'apporte pas une amélioration sensible à l'enrichissement de S. typhi : les courbes de croissance peuvent être confondues au niveau des portions de courbe correspondant à la phase stationnaire.

Le temps de latence de S. typhi dans le milieu au tétrathionate est plus important que dans le milieu au sélénite où il est pratiquement inexistant.

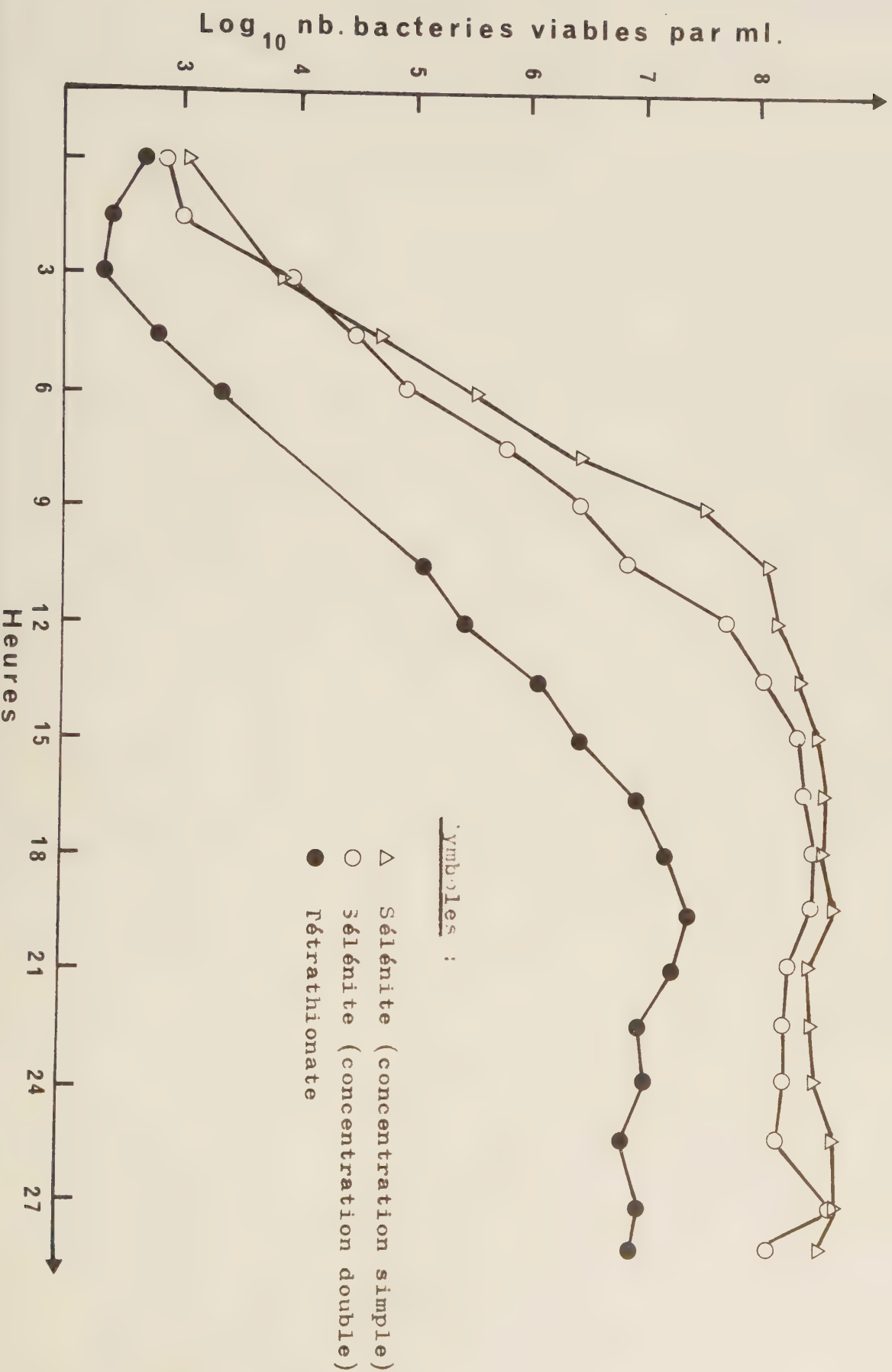
TABLEAU X

Numération en fonction du temps de Salmonella typhi L.M.H. 50, dans différents milieux d'enrichissement, après incubation à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures.

Heure de Prélèvement	Milieux					
	Sélénite		Sélénite double		Tétrathionate	
	N	$\text{Log}_{10} \text{N}$	N	$\text{Log}_{10} \text{N}$	N	$\text{Log}_{10} \text{N}$
T ₁	$1,26 \cdot 10^3$	3,10	$5,30 \cdot 10^2$	2,72	$5,00 \cdot 10^2$	2,70
T ₂	-	-	$8,80 \cdot 10^2$	2,94	$2,40 \cdot 10^2$	2,38
T ₃	$8,90 \cdot 10^3$	3,95	$8,30 \cdot 10^3$	3,92	$2,30 \cdot 10^2$	2,36
T ₄	$6,30 \cdot 10^4$	4,80	$3,00 \cdot 10^4$	4,48	$6,20 \cdot 10^2$	2,79
T ₅	$4,20 \cdot 10^5$	5,62	$8,30 \cdot 10^4$	4,92	$2,30 \cdot 10^3$	3,36
T ₆	$3,00 \cdot 10^6$	6,48	$5,60 \cdot 10^5$	5,75	-	-
T ₇	$3,94 \cdot 10^7$	7,50	$2,52 \cdot 10^6$	6,40	-	-
T ₈	$1,46 \cdot 10^9$	8,16	$6,40 \cdot 10^6$	6,81	$1,19 \cdot 10^5$	5,08
T ₉	$1,52 \cdot 10^9$	8,18	$4,80 \cdot 10^7$	7,68	$2,85 \cdot 10^5$	5,45
T ₁₀	$2,79 \cdot 10^8$	8,45	$1,04 \cdot 10^8$	8,02	$1,18 \cdot 10^6$	6,07
T ₁₁	$3,48 \cdot 10^8$	8,54	$1,27 \cdot 10^8$	8,20	$5,60 \cdot 10^6$	6,75
T ₁₂	$3,88 \cdot 10^8$	8,59	$2,25 \cdot 10^8$	8,35	$7,40 \cdot 10^6$	6,87
T ₁₃	$3,80 \cdot 10^8$	8,58	$2,32 \cdot 10^8$	8,45	$1,21 \cdot 10^7$	7,08
T ₁₄	$5,10 \cdot 10^8$	8,71	$2,72 \cdot 10^8$	8,43	$2,71 \cdot 10^7$	7,43
T ₁₅	$3,29 \cdot 10^8$	8,52	$1,66 \cdot 10^8$	8,22	$2,10 \cdot 10^7$	7,32
T ₁₆	$3,18 \cdot 10^8$	8,50	$1,59 \cdot 10^8$	8,20	$9,80 \cdot 10^6$	6,99
T ₁₇	$3,03 \cdot 10^8$	8,48	$1,36 \cdot 10^8$	8,13	$1,07 \cdot 10^7$	7,03
T ₁₈	$4,15 \cdot 10^8$	8,62	$1,78 \cdot 10^8$	8,25	$6,60 \cdot 10^6$	6,82
T ₁₉	$5,02 \cdot 10^8$	8,70	$4,12 \cdot 10^8$	8,61	$2,20 \cdot 10^6$	6,34
T ₂₀	$4,27 \cdot 10^8$	8,63	$1,00 \cdot 10^8$	8,00	$7,80 \cdot 10^6$	6,89

N = Nombre de bactéries/ml.

Fig.: 13 - Courbe de croissance de Salmonella typhi L.M.H. 50 dans un milieu d'enrichissement au sélénite- à simple et double concentration -et au tétrathionate, incubé à la température de + 37° C.



3.2. Croissance de S. brancaster en présence d'un compétiteur dans un milieu d'enrichissement.

3.2.1. Sensibilité de détection des milieux utilisés par la méthode du N.P.P.

La numération des germes ne pouvant se faire sur milieu gélosé, nous avons testé préalablement si les bouillons utilisés pour la numération donnaient une concentration bactérienne finale identique à celle de départ après une incubation de 48 heures à $+ 37^{\circ} \text{C}$.

TABLEAU XI

Sensibilité de détection du milieu "eau peptonée avec indicateur d' H_2S "
Numération par la méthode du N.P.P. du mélange S. brancaster - E. coli

Suspensions bactériennes initiales	Dilutions		Nombre de tubes présentant		N.P.P./ml	
			H_2S^+	Indole ⁺	<u>Salmonella</u>	<u>E. coli</u>
Mélange 1 - $4,8 \cdot 10^2/\text{ml}$ <u>S. brancaster</u> $3,9 \cdot 10^6/\text{ml}$ <u>E. coli</u>	3 x 1ml	Pur	+++	+++	240	$4,3 \cdot 10^6$
		10^{-1}	+++	+++		
		10^{-2}	+++	+++		
		10^{-3}	---	+++		
		10^{-4}	---	+++		
		10^{-5}	---	+++		
		10^{-6}	---	+++		
		10^{-7}	---	---		
		10^{-8}	---	---		
Mélange 2 $4,8 \cdot 10^6/\text{ml}$ <u>S. brancaster</u> $3,9 \cdot 10^2/\text{ml}$ <u>E. coli</u>	3 x 1ml	Pur	+++	+++	$2,4 \cdot 10^6$	240
		10^{-1}	+++	+++		
		10^{-2}	+++	+++		
		10^{-3}	+++	---		
		10^{-4}	+++	---		
		10^{-5}	+++	---		
		10^{-6}	+++	---		
		10^{-7}	---	---		
		10^{-8}	---	---		

Les résultats consignés dans les Tableaux VI et XII montrent que la précision de la numération par la méthode du N.P.P. est bonne : les titres initiaux en bactéries sont retrouvés, en fin d'expérimentation, aussi bien pour les concentrations faibles (10^2) que pour les concentrations plus élevées (10^6).

TABLEAU XII

Sensibilité de détection du milieu "Saccharosé". Numération de N. pneumoniae par la méthode du N.P.P. dans un mélange avec S. brancaster

Mélange/ml	Dilutions		Nombre de tubes positifs	N.P.P./ml
$8,5.10^3$ /ml <u>N. pneumoniae</u> + $2,4.10^7$ /ml <u>S. brancaster</u>	3 x 1 ml	Pur	+++	$2,3.10^3$
		10^{-1}	+++	
		10^{-2}	+++	
		10^{-3}	+++	
		10^{-4}	++-	
		10^{-5}	---	
		10^{-6}	---	
		10^{-7}	---	
		10^{-8}	---	
		10^{-9}	---	
		10^{-10}	---	

3.2.2. Action du tétrathionate de sodium.

3.2.2.1. Sur le mélange : N. coli-S. brancaster =. =. =. =. =. =.

Les Tableaux XIII, XIV et les Fig. 14 et 15, qui représentent les résultats obtenus, montrent une inhibition très rapide

TABLEAU XIII

SOUCHES	TEMPS	N.P.P/ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> ($1,50 \cdot 10^7$ /ml)	T ₁	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32
	T ₂	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₃	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32
	T ₄	$9,3 \cdot 10^4$	4,97	$1,5 \cdot 10^4$	4,18	$3,8 \cdot 10^5$	5,58
	T ₅	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$1,0 \cdot 10^3$	3,00	$2,3 \cdot 10^4$	4,36
	T ₆	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₇	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58
	T ₈	$9,3 \cdot 10^6$	6,97	$1,5 \cdot 10^6$	6,18	$3,8 \cdot 10^7$	7,58
	T ₉	$7,0 \cdot 10^8$	8,84	$1,0 \cdot 10^8$	8,00	$2,3 \cdot 10^9$	9,36
	T ₁₀	$2,4 \cdot 10^8$	8,38	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$1,3 \cdot 10^9$	9,11
	T ₁₁	$4,3 \cdot 10^3$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
<u>E. coli</u> ($1,55 \cdot 10^6$ /ml)	T ₁	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₂	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₃	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32
	T ₄	$9,3 \cdot 10^2$	2,97	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,8 \cdot 10^2$	3,58
	T ₅	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₆	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₇	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₈	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₉	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32
	T ₁₀	$9,3 \cdot 10^3$	3,97	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₁₁	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.M.H. 4603 et E. coli L.M.H. 79, dans le mélange S. brancaster - E. coli.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

- E. coli L.M.V. 70
- ▲ S. brancaster L.M.I. 4000
- ⊥ Intervalle de confiance.
- Tracé points par points.

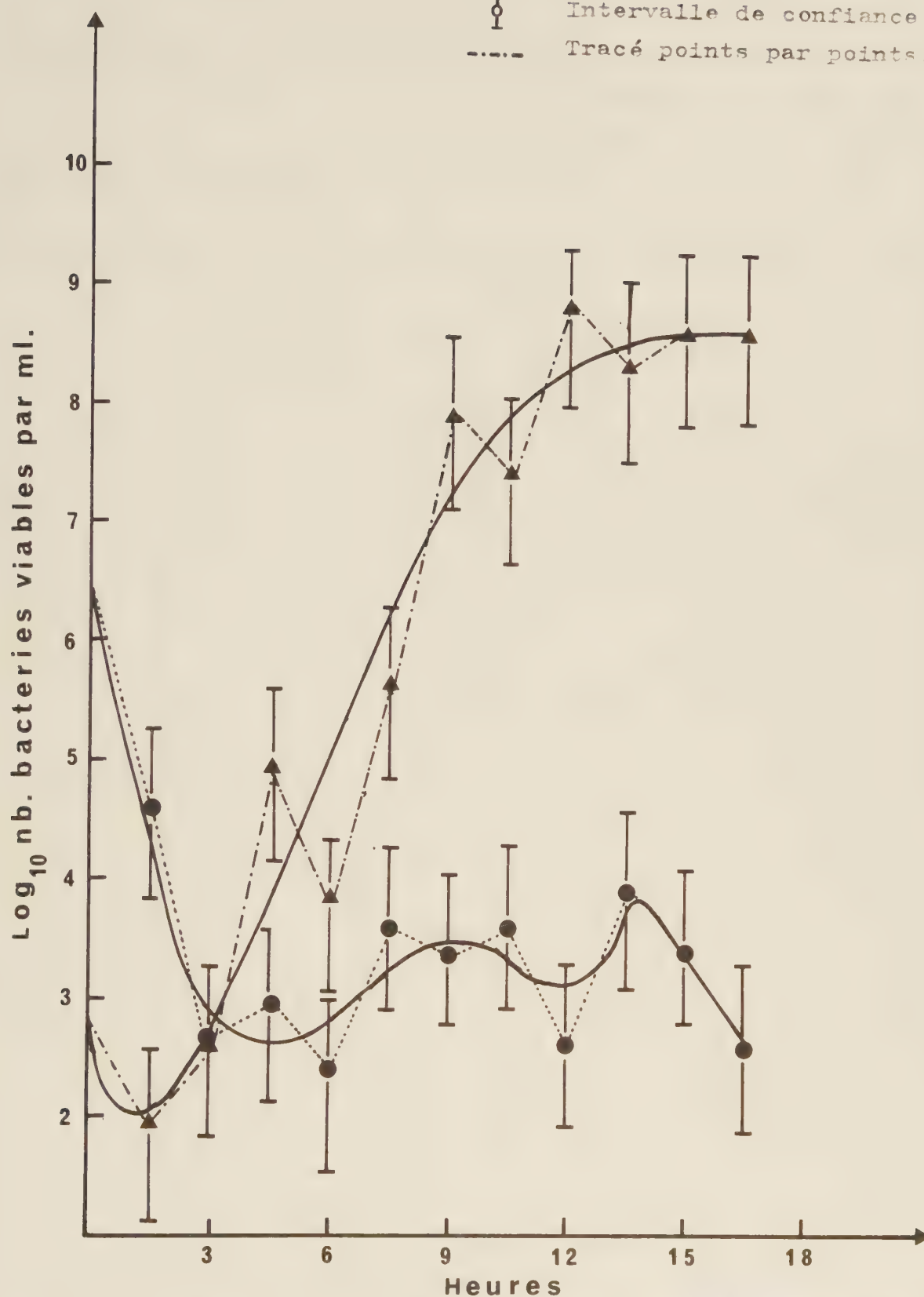


Fig.: 14 - Courbe de croissance d'E. coli et de S. brancaster
 en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au
 tétrathionate après incubation à + 43° C.

TABLEAU XIV

SOUCHES	TEMPS	N.P.P/ml	$\text{Log}_{10} I$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> (1/ml)	T ₁	2,3	0,36	0,4	0	$1,2 \cdot 10^1$	1,08
	T ₂	4,3	0,63	0,7	0	$2,1 \cdot 10^1$	1,32
	T ₃	9,3	0,97	1,5	0,18	$3,8 \cdot 10^1$	1,58
	T ₄	$2,4 \cdot 10^1$	1,38	3,6	0,56	$1,3 \cdot 10^2$	2,11
	T ₅	$9,3 \cdot 10^2$	2,97	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,8 \cdot 10^3$	2,58
	T ₆	$9,3 \cdot 10^3$	3,97	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₇	$2,4 \cdot 10^5$	5,38	$3,6 \cdot 10^4$	4,56	$1,3 \cdot 10^6$	6,11
	T ₈	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₉	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₁₀	-	-	-	-	-	-
	T ₁₁	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,0 \cdot 10^7$	7,48	$4,4 \cdot 10^8$	8,64
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
<u>E. coli</u> ($1,28 \cdot 10^6$ /ml)	T ₁	$2,4 \cdot 10^5$	5,38	$3,6 \cdot 10^4$	4,56	$1,3 \cdot 10^6$	6,11
	T ₂	$9,3 \cdot 10^2$	2,97	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,8 \cdot 10^3$	3,58
	T ₃	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,0 \cdot 10^1$	1,48	$4,4 \cdot 10^2$	2,64
	T ₄	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,0 \cdot 10^1$	1,48	$4,4 \cdot 10^2$	2,64
	T ₅	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₆	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,0 \cdot 10^1$	1,48	$4,4 \cdot 10^2$	2,64
	T ₇	$2,4 \cdot 10^1$	1,38	3,6	0,56	$1,3 \cdot 10^2$	2,11
	T ₈	$4,3 \cdot 10^1$	1,63	7,0	0,84	$2,1 \cdot 10^2$	2,32
	T ₉	$2,4 \cdot 10^1$	1,38	3,6	0,56	$1,3 \cdot 10^2$	2,11
	T ₁₀	$2,4 \cdot 10^1$	1,38	3,6	0,56	$1,3 \cdot 10^2$	2,11
	T ₁₁	4,3	0,63	0,7	0	$2,1 \cdot 10^1$	1,32
	T ₁₂	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.M.H. 460 et E. coli L.M.H. 79, dans le mélange S. brancaster - E. coli.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

- E. coli L.M.H. 79
- ▲ S. brancaster L.M.H. 4603
- ⌋⌋ Intervalle de confiance.
- Tracé points par points.

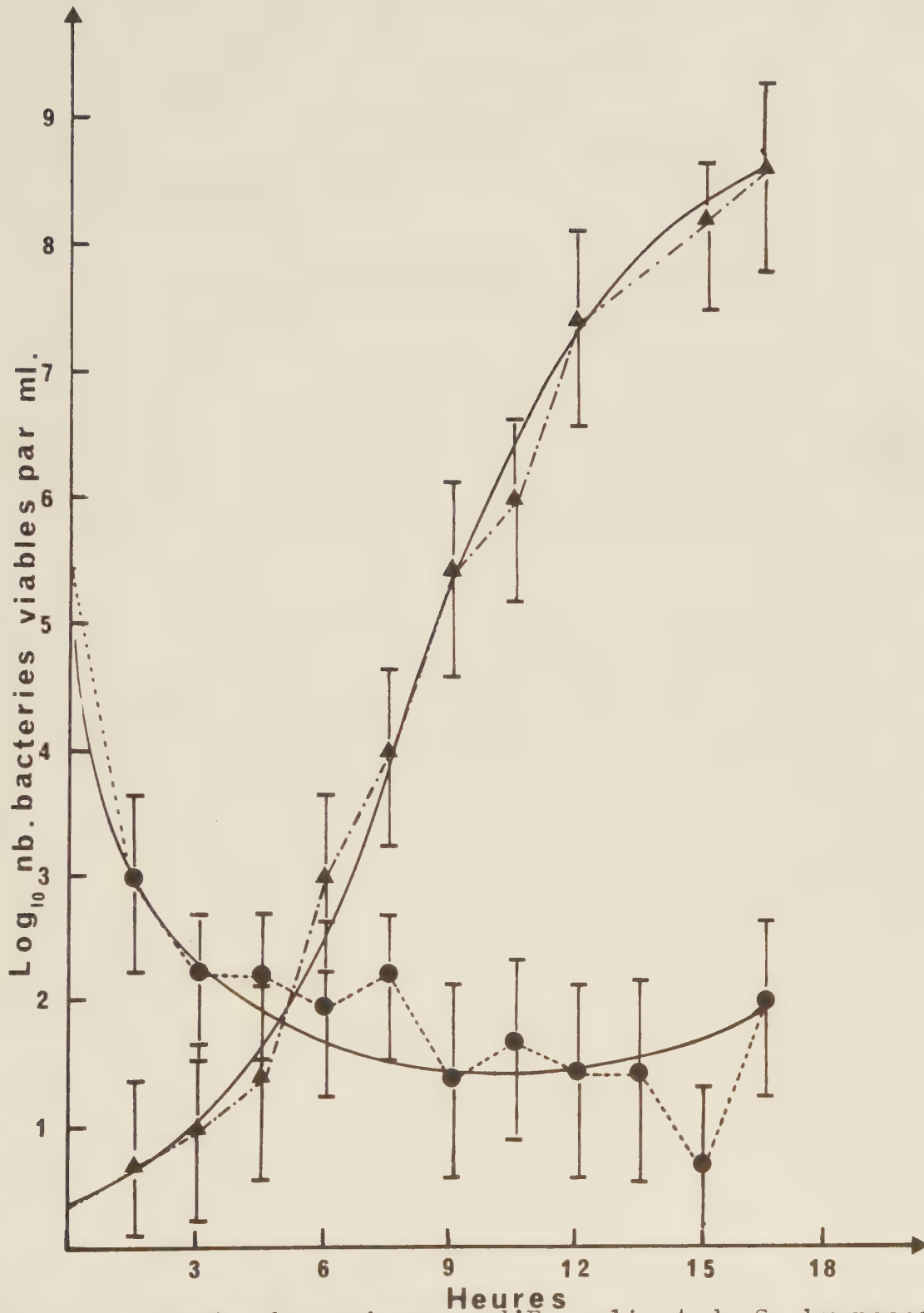


Fig.: 15 - Courbe de croissance d'E. coli et de S. brancaster en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au tétrathionate après incubation à + 43° C.

de la croissance, dans les 3 premières heures, d'E. coli.

Son développement est alors compromis : le nombre de bactéries oscille autour d'une concentration moyenne de $10^3/\text{ml}$ - $10^2/\text{ml}$ dans le cas d'un mélange avec 1 Salmonella par ml ou avec 100 Salmonella par ml.

Indépendamment, S. brancaster se multiplie dans le milieu.

Après un temps de latence de une heure et demie, la croissance se poursuit au cours du temps, conforme aux prévisions attendues. Au bout de 18 heures, nous avons un fort enrichissement en Salmonella. 10^8 organismes/ml sont obtenus à partir d'une concentration initiale de $10^2/\text{ml}$ ou $1/\text{ml}$.

3.2.2.2. Sur le mélange: K.pneumoniae - S.brancaster. =. =. =. =. =. =. =.

La croissance de S. brancaster, en présence de K. pneumoniae est identique à celle trouvée dans le mélange précédent. Tous les points de la courbe sont confirmés. La lecture des Tableaux XV et XVI et des Fig. 16 et 17 fait ressortir que le mode d'action du mélange tétrathionate-thiosulfate sur le développement de K. pneumoniae est différent de celui sur E. coli.

Bien que le résultat soit globalement le même - déclin du nombre de bactéries jusqu'à un niveau de $10^3/\text{ml}$ - la courbe de croissance est différente : il existe une phase de latence, de plus d'une heure, chez K. pneumoniae.

L'enrichissement en Salmonella est important ($10^9/\text{ml}$) : sa croissance, quel que soit le nombre ensemencé au départ (1 ou $10^2/\text{ml}$), est toujours la même.

TABLEAU XV

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> ($1,27 \cdot 10^2/\text{ml}$)	T ₁	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,0 \cdot 10^1$	1,48	$4,4 \cdot 10^2$	2,64
	T ₂	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₃	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₄	$9,3 \cdot 10^3$	3,97	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₅	$9,3 \cdot 10^4$	4,97	$1,5 \cdot 10^4$	4,18	$3,8 \cdot 10^5$	5,58
	T ₆	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₇	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₈	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,0 \cdot 10^7$	7,48	$4,4 \cdot 10^8$	8,64
	T ₉	-	-	-	-	-	-
	T ₁₀	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₁₁	$1,5 \cdot 10^9$	9,18	$3,0 \cdot 10^8$	8,48	$4,4 \cdot 10^9$	9,64
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
<u>K. pneumoniae</u> ($8,9 \cdot 10^4/\text{ml}$)	T ₁	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,0 \cdot 10^4$	4,48	$4,4 \cdot 10^5$	5,64
	T ₂	$2,1 \cdot 10^5$	5,32	$4,0 \cdot 10^4$	4,60	$4,7 \cdot 10^5$	5,67
	T ₃	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₄	$9,3 \cdot 10^4$	4,97	$1,5 \cdot 10^4$	4,18	$3,8 \cdot 10^5$	5,58
	T ₅	$2,1 \cdot 10^4$	4,32	$4,0 \cdot 10^3$	3,60	$4,7 \cdot 10^4$	4,67
	T ₆	$2,1 \cdot 10^4$	4,32	$4,0 \cdot 10^3$	3,60	$4,7 \cdot 10^4$	4,67
	T ₇	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₈	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₉	-	-	-	-	-	-
	T ₁₀	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₁₁	$9,3 \cdot 10^2$	2,97	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$3,8 \cdot 10^3$	3,58
	T ₁₂	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.H.H. 4603
et K. pneumoniae A.T.C.C. 10.031, dans le mélange S. brancaster -
K. pneumoniae.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Symboles :

● K. pneumoniae A.T.C.C. 10029

▲ S. brancaster L.M.H. 4603

I Intervalle de confiance.

----- Tracé points par points.

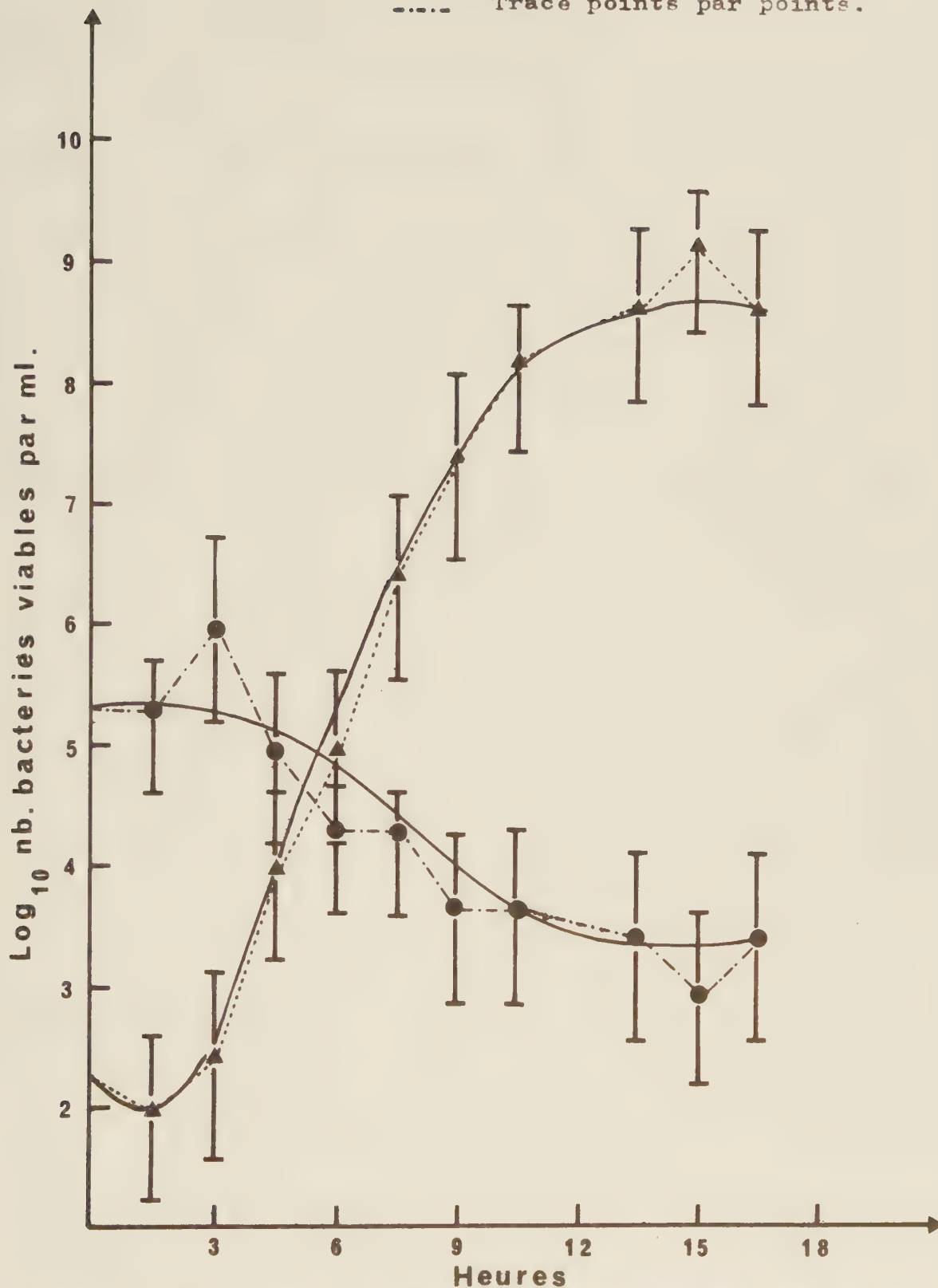


Fig.: 16 - Courbe de croissance de K. pneumoniae et de S. brancaster en culture mixte, dans un bouillon d'enrichissement au tétrathionate après incubation à + 43° C.

TABLEAU XVI

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} I_d$	Ls	$\text{Log}_{10} L_s$
<u>S. brancaster</u> 1 ml	T ₁	1,0	0	/	/	/	/
	T ₂	2,3	0,36	0,4	0	$1,2 \cdot 10^1$	1,08
	T ₃	4,3	0,63	0,7	0	$2,1 \cdot 10^1$	1,32
	T ₄	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₅	$2,1 \cdot 10^2$	2,32	$4,0 \cdot 10^1$	1,60	$4,7 \cdot 10^2$	2,67
	T ₆	$2,4 \cdot 10^4$	4,38	$3,6 \cdot 10^3$	3,56	$1,3 \cdot 10^5$	5,11
	T ₇	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₈	$9,3 \cdot 10^6$	6,97	$1,5 \cdot 10^6$	6,18	$3,8 \cdot 10^7$	7,58
	T ₉	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₁₀	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₁₁	$9,3 \cdot 10^8$	8,97	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
	T ₁₂	$9,3 \cdot 10^8$	8,97	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
<u>K. pneumoniae</u> ($3,9 \cdot 10^5$ /ml)	T ₁	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^4$	6,58
	T ₂	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^5$	6,58
	T ₃	$2,4 \cdot 10^4$	4,38	$3,6 \cdot 10^3$	3,56	$1,3 \cdot 10^5$	5,11
	T ₄	$2,4 \cdot 10^4$	4,38	$3,6 \cdot 10^3$	3,56	$1,3 \cdot 10^5$	5,11
	T ₅	$2,4 \cdot 10^4$	4,38	$3,6 \cdot 10^3$	3,56	$1,3 \cdot 10^5$	5,11
	T ₆	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₇	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₈	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32
	T ₉	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₁₀	-	-	-	-	-	-
	T ₁₁	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₁₂	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.M.H. 4603 et K. pneumoniae A.T.C.C. 10.031 dans un mélange S. brancaster - K. pneumoniae.

- Action du tétrathionate après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Symboles :

- ▲ K. pneumoniae A.T.C.C. 10.021
- S. brancaster L.M.H. 4603
- ⊞ Intervalle de confiance.
- Tracé points par points.

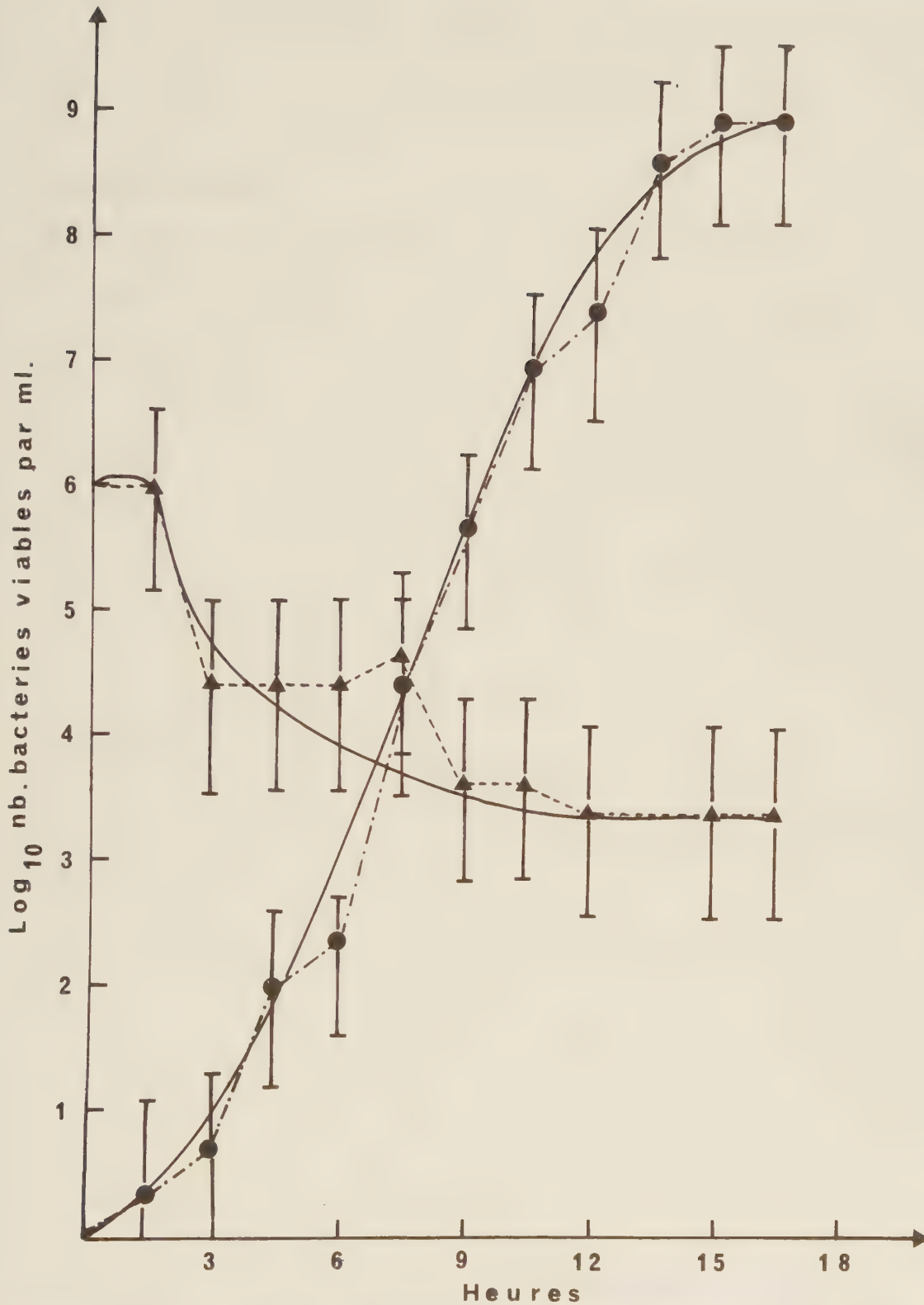


Fig.: 17- Courbe de croissance de K. pneumoniae et de S. brancaster en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au tétrathionate après incubation à + 43° C.

3.2.2.3. Comparaison des courbes de croissance
 =.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.=.
 de S. brancaster, E. coli et K. pneumoniae.

* S. brancaster.

La Fig 18, qui représente la superposition des courbes de croissance de S. brancaster en culture avec E. coli et K. pneumoniae, permet de faire les remarques suivantes :

- les pentes des courbes de croissance sont toutes identiques quelle que soit la concentration en Salmonella au départ.
 Il y a simplement un décalage des courbes.
 Ces pentes sont identiques à celles en culture pure.
- La concentration finale est la même dans tous les cas.

* E. coli - K. pneumoniae.

L'examen de la Fig. 19 nous précise deux points :

- pas de reprise de croissance pour E. coli et K. pneumoniae en culture avec S. brancaster.
- phase de latence, d'environ une heure et demie pour K.pneumoniae.

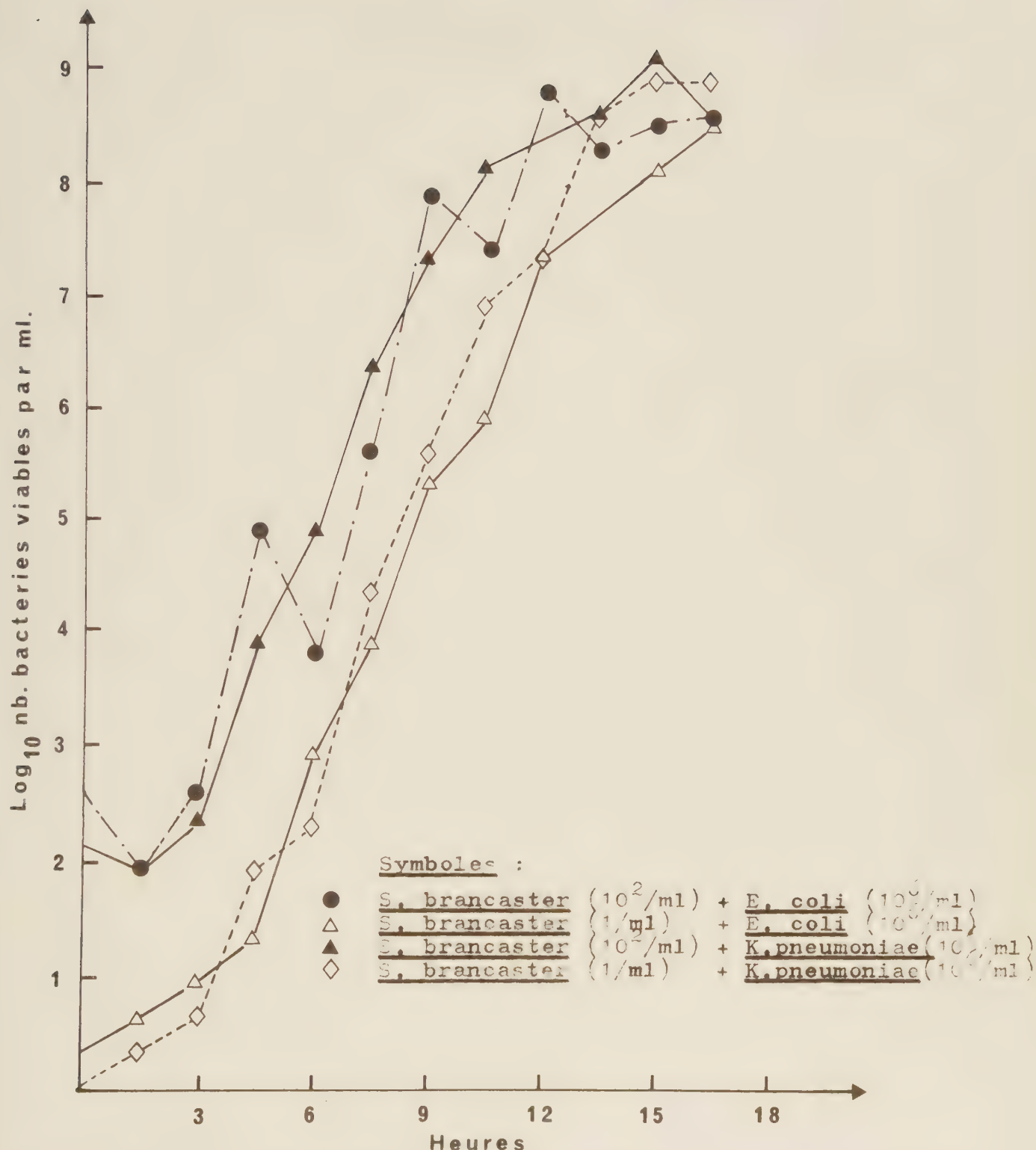


Fig.: 18 - Comparaison des courbes de croissance de S. brancaster L.M.H. 4603, à des concentrations de 1 et $10^2/\text{ml}$, en culture mixte avec :

- 1°) E. coli L.M.H. 79
- 2°) K. pneumoniae L.T.C.C. 10031

dans un milieu au tétrathionate.

Symboles :

- E. coli (10^6 /ml) + S. brancaster (10^2 /ml)
- △ E. coli (10^6 /ml) + S. brancaster (1/ml)
- ▲ K. pneumoniae (10^6 /ml) + S. brancaster (10^2 /ml)
- ◇ K. pneumoniae (10^6 /ml) + S. brancaster (1/ml)

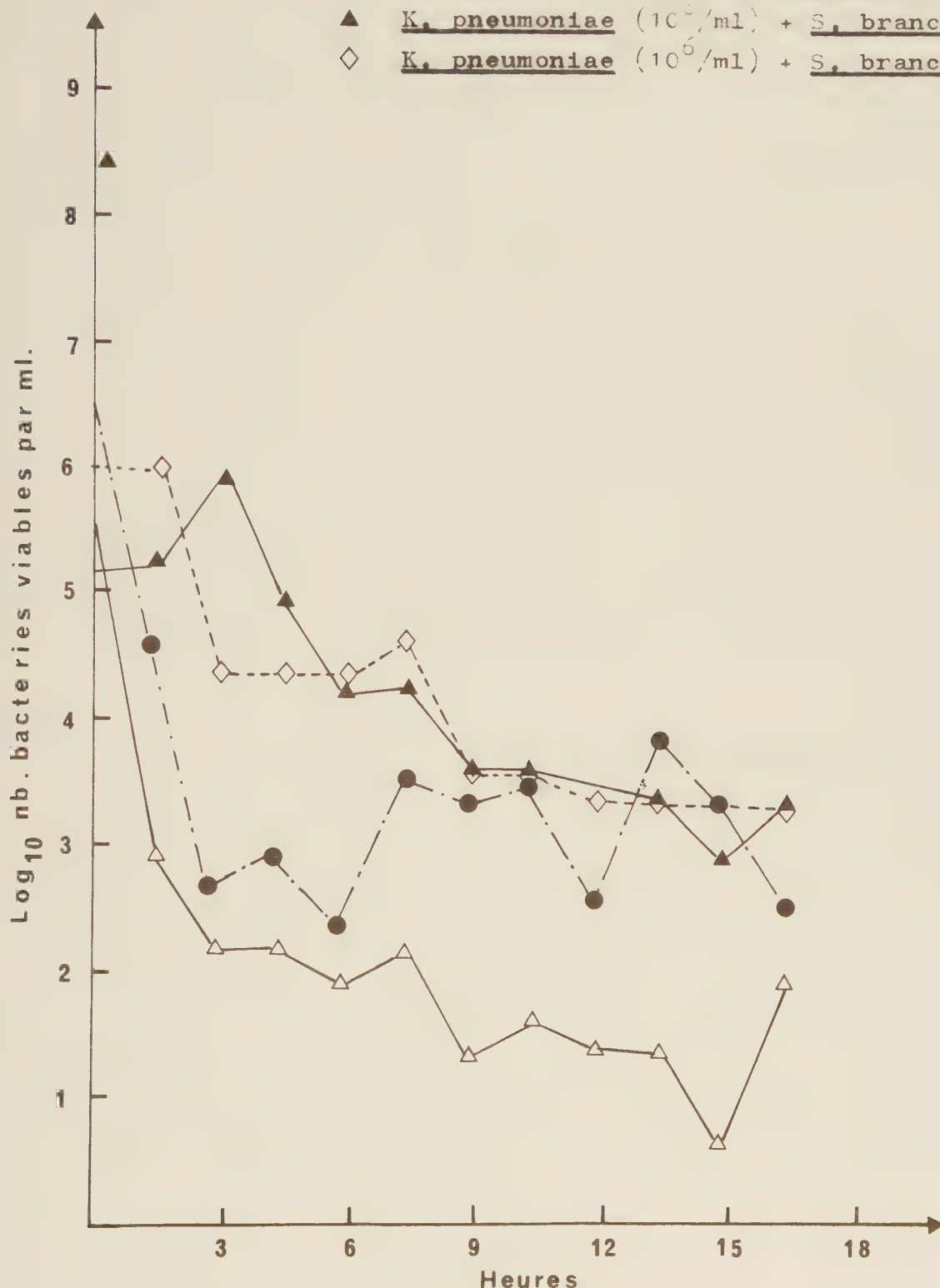


Fig.: 19 - Comparaison des courbes de croissance de K. pneumoniae A.T.C.C. 10031 et d'E. coli L.M.H. 79, à des concentrations de 10^6 /ml, en culture mixte avec S. brancaster L.M.H. 4603, dans le milieu au tétrathionate.

3.2.3. Action du sélénite de sodium.

3.2.3.1. Mélange : E. coli - S. brancaster. =. =. =. =.

La lecture des Tableaux XVII et XVIII et des Fig. 20 et 21 fait ressortir que, selon le nombre de Salmonella mises au départ dans le fermenteur (1 ou 100 par ml), les courbes, concernant la croissance d'E. coli, sont différentes.

A partir du mélange S. brancaster (1/ml) - E. coli (10^6 /ml) nous constatons une reprise de croissance d'E. coli après 4 heures d'incubation, alors que pour l'autre mélange on note une inhibition. Bien que la croissance des Salmonella soit identique dans un cas comme dans l'autre, la réussite de mettre en évidence ces dernières, semble compromise quand le rapport des bactéries compétitrices est de 1/ml pour 10^6 /ml.

3.2.3.2. Mélange : K. pneumoniae - S. brancaster. =. =. =. =.

Ce qui frappe dans la comparaison des courbes de croissance, donnée par les Fig. 22 et 23 à partir des résultats collationnés dans les Tableaux XIX et XX, c'est l'indépendance relative de la croissance de K. pneumoniae et de S. brancaster. Chacun suit sa propre loi de croissance.

L'enrichissement en Salmonella est nul puisque, dans le même temps, K. pneumoniae s'est développée dans le même rapport.

TABLEAU XVII

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Lg}_{10} Li$	Ls	$\text{Lg}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> ($1,52 \cdot 10^6/\text{ml}$)	T ₁	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₂	$4,3 \cdot 10^2$	2,63	$7,0 \cdot 10^1$	1,84	$2,1 \cdot 10^3$	3,32
	T ₃	$2,1 \cdot 10^2$	2,32	$4,0 \cdot 10^1$	1,60	$4,7 \cdot 10^2$	2,67
	T ₄	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₅	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₆	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₇	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,0 \cdot 10^7$	7,48	$4,4 \cdot 10^8$	8,64
	T ₈	$9,8 \cdot 10^8$	8,99	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
	T ₉	$9,8 \cdot 10^8$	8,99	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
	T ₁₀	$4,6 \cdot 10^9$	9,66	$7,1 \cdot 10^8$	8,85	$2,4 \cdot 10^{10}$	10,38
	T ₁₁	$9,8 \cdot 10^8$	8,99	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
	T ₁₂	$9,8 \cdot 10^8$	8,99	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,8 \cdot 10^9$	9,58
<u>E. coli</u> ($1,85 \cdot 10^5/\text{ml}$)	T ₁	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,34	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₂	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₃	$1,5 \cdot 10^8$	8,18	$3,0 \cdot 10^7$	7,48	$4,4 \cdot 10^8$	8,64
	T ₄	$2,7 \cdot 10^7$	7,43	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₅	$7,5 \cdot 10^4$	4,87	$1,4 \cdot 10^4$	4,15	$2,3 \cdot 10^5$	5,36
	T ₆	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₇	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₈	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₉	$9,8 \cdot 10^3$	3,99	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₁₀	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₁₁	$9,8 \cdot 10^3$	3,99	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^3$	3,63	$7,0 \cdot 10^2$	2,84	$2,1 \cdot 10^4$	4,32

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.M.H. 4603 et E. coli L.M.H. 79, dans le mélange S. brancaster - E. coli.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Symboles : ● E. coli L.M.H. 79
 ▲ S. brancaster L.M.H. 4603
 I Intervalle de confiance.
 ... Tracé points par points.

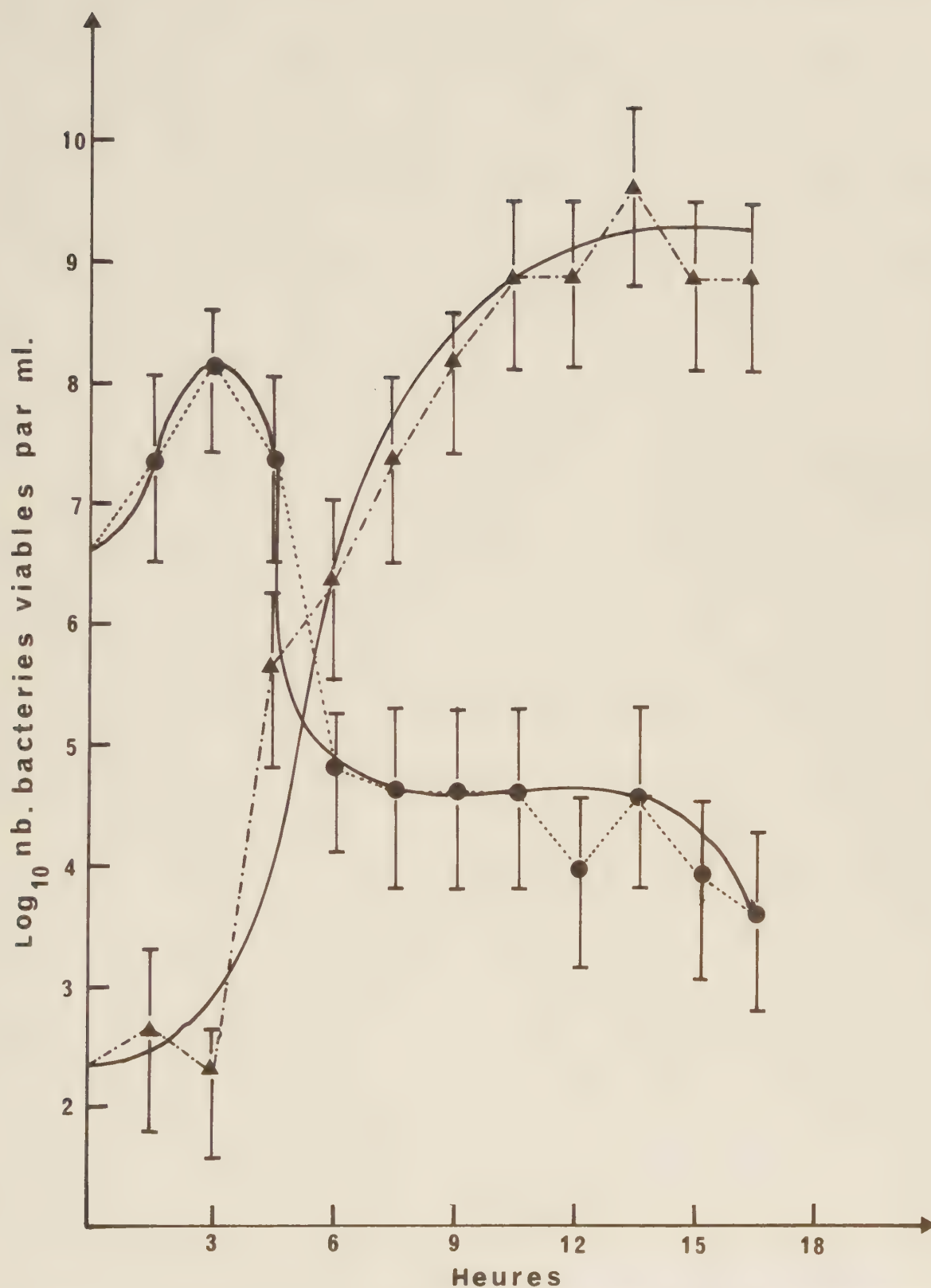


Fig.: 20 - Courbe de croissance d'E. coli et de Salmonella brancaster en culture mixte, dans un bouillon d'enrichissement au sélénite après incubation à + 43° C.

TABLEAU XVIII

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> (1/ml)	T ₁	2,4	0,38	0,3	0	$1,3 \cdot 10^1$	1,11
	T ₂	2,4	0,38	0,3	0	$1,3 \cdot 10^1$	1,11
	T ₃	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₄	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₅	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₆	$9,3 \cdot 10^3$	3,97	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₇	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₈	$7,5 \cdot 10^6$	6,87	$1,4 \cdot 10^6$	6,15	$2,3 \cdot 10^7$	7,36
	T ₉	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₁₀	$2,4 \cdot 10^7$	7,38	$3,6 \cdot 10^6$	6,56	$1,3 \cdot 10^8$	8,11
	T ₁₁	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₁₂	$2,4 \cdot 10^8$	8,38	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$1,3 \cdot 10^9$	9,11
<u>E. coli</u> ($2,1 \cdot 10^5$ /ml)	T ₁	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₂	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₃	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₄	$2,4 \cdot 10^5$	5,38	$3,6 \cdot 10^4$	4,56	$1,3 \cdot 10^6$	6,11
	T ₅	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₆	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₇	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₈	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,0 \cdot 10^6$	6,48	$4,4 \cdot 10^7$	7,64
	T ₉	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₁₀	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58
	T ₁₁	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.M.H. 4603 et E. coli L.M.H. 79, dans le mélange S. brancaster - E. coli.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

E. coli L.M.N. 7.S. brancaster L.M.N. 46 .

Intervalle de confiance .



Tracé points par points .

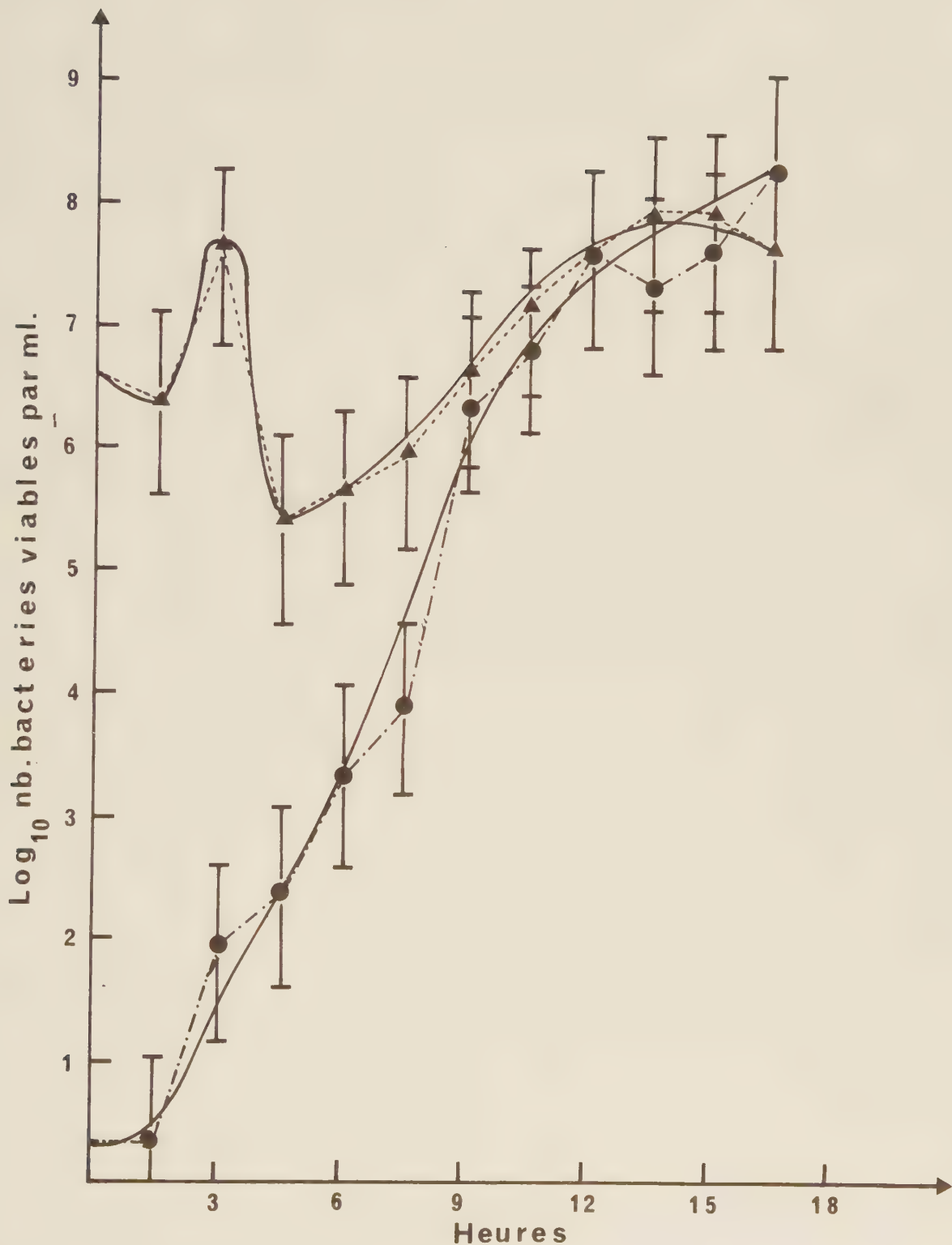


Fig.: 21 - Courbe de croissance d'E. coli et de S. brancaster en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au sélénite après incubation à + 43° C.

TABLEAU XIX

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. bronchiae</u> ($5,1 \cdot 10^4$ /ml)	T ₁	$9,3 \cdot 10^1$	1,97	$1,5 \cdot 10^1$	1,18	$3,8 \cdot 10^2$	2,58
	T ₂	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₃	$2,3 \cdot 10^2$	2,27	$1,5 \cdot 10^2$	2,18	$2,8 \cdot 10^3$	3,58
	T ₄	$2,4 \cdot 10^5$	5,38	$3,6 \cdot 10^4$	4,56	$1,3 \cdot 10^6$	6,11
	T ₅	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
	T ₆	$1,5 \cdot 10^6$	6,18	$3,0 \cdot 10^5$	5,48	$4,4 \cdot 10^6$	6,64
	T ₇	$2,3 \cdot 10^6$	6,27	$1,5 \cdot 10^6$	6,18	$3,8 \cdot 10^7$	7,58
	T ₈	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₉	-	-	-	-	-	-
	T ₁₀	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₁₁	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₁₂	$2,4 \cdot 10^6$	6,38	$3,6 \cdot 10^5$	5,56	$1,3 \cdot 10^7$	7,11
<u>K. pneumoniae</u> ($7,8 \cdot 10^5$ /ml)	T ₁	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₂	$2,3 \cdot 10^5$	5,27	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₃	$2,3 \cdot 10^5$	5,27	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₄	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₅	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₆	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₇	$1,5 \cdot 10^9$	9,18	$3,0 \cdot 10^7$	7,48	$4,4 \cdot 10^9$	9,64
	T ₈	$2,4 \cdot 10^8$	8,38	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$1,3 \cdot 10^9$	9,11
	T ₉	-	-	-	-	-	-
	T ₁₀	$1,5 \cdot 10^9$	9,18	$3,0 \cdot 10^8$	8,48	$4,4 \cdot 10^9$	9,64
	T ₁₁	$4,3 \cdot 10^9$	9,63	$7,0 \cdot 10^8$	8,84	$2,1 \cdot 10^{10}$	10,32
	T ₁₂	$4,3 \cdot 10^9$	9,63	$7,0 \cdot 10^8$	8,84	$2,1 \cdot 10^{10}$	10,32

Numération par la méthode du N.P.P. de S. bronchiae L.M.H. 4603 et K. pneumoniae A.T.C.C. 10.031, dans le mélange S. bronchiae - K. pneumoniae.

- Action du Sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

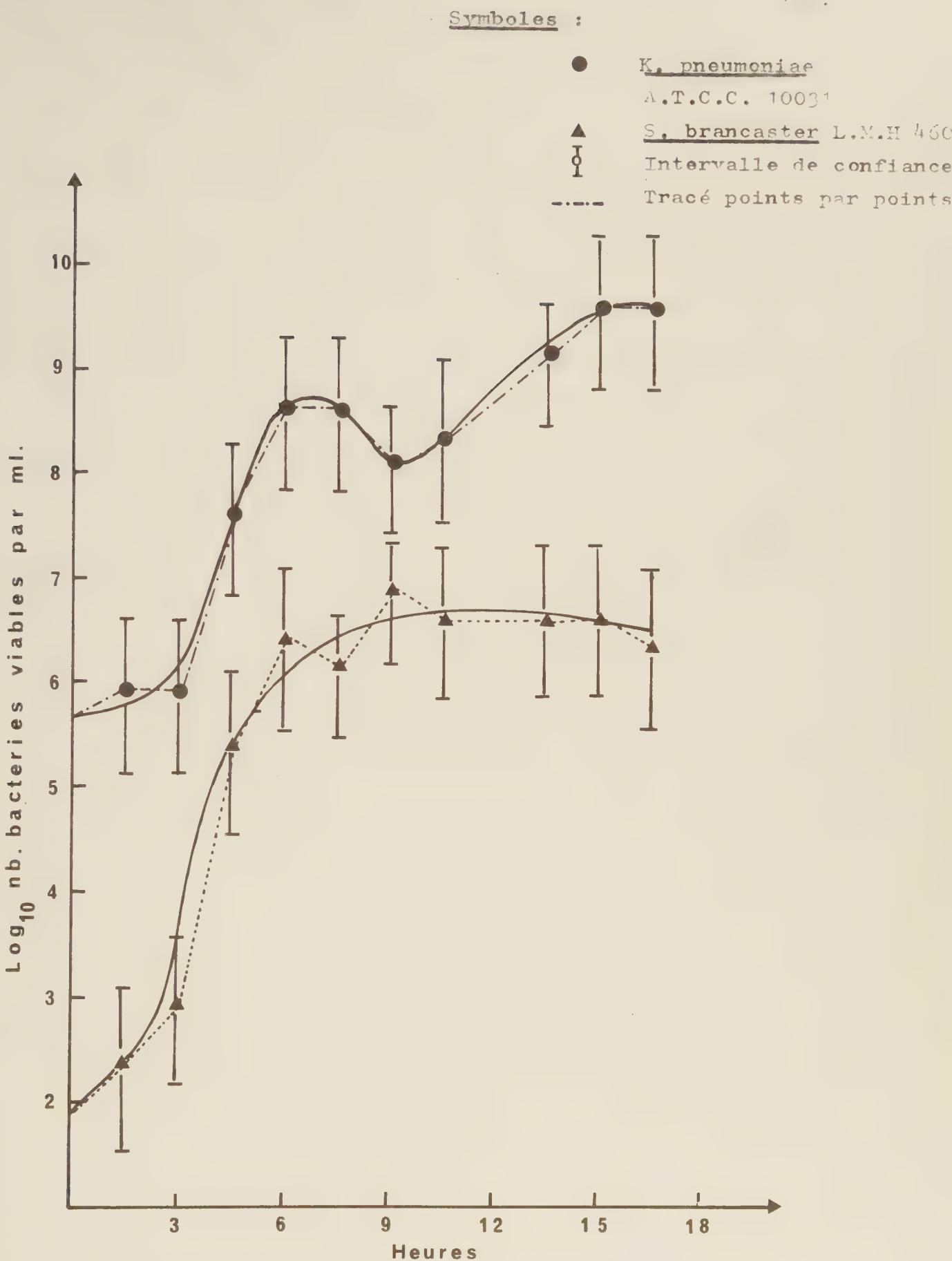


Fig.: 22 - Courbe de croissance de K. pneumoniae et de S. brancaster en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au sélénite après incubation à + 43° C.

TABLEAU XX

SOUCHES	TEMPS	N.P.P./ml = I_c	$\text{Log}_{10} I_c$	INTERVALLE DE CONFIANCE 95 %			
				Limite Inférieure		Limite Supérieure	
				Li	$\text{Log}_{10} Li$	Ls	$\text{Log}_{10} Ls$
<u>S. brancaster</u> (1/ml)	T ₁	2,4	0,38	0,6	0	$1,3 \cdot 10^1$	1,11
	T ₂	2,4	0,38	0,6	0	$1,3 \cdot 10^1$	1,11
	T ₃	2,3	0,27	1,5	0,18	$3,2 \cdot 10^1$	1,53
	T ₄	$2,4 \cdot 10^2$	2,38	$3,6 \cdot 10^1$	1,56	$1,3 \cdot 10^3$	3,11
	T ₅	$2,4 \cdot 10^3$	3,38	$3,6 \cdot 10^2$	2,56	$1,3 \cdot 10^4$	4,11
	T ₆	$2,3 \cdot 10^3$	2,97	$1,5 \cdot 10^3$	3,18	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
	T ₇	$4,3 \cdot 10^4$	4,63	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	$2,1 \cdot 10^5$	5,32
	T ₈	$7,5 \cdot 10^4$	4,87	$1,4 \cdot 10^4$	4,15	$2,3 \cdot 10^5$	5,36
	T ₉	$2,4 \cdot 10^5$	5,38	$3,6 \cdot 10^4$	4,56	$1,3 \cdot 10^6$	6,11
	T ₁₀	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₁₁	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₁₂	$1,5 \cdot 10^6$	6,18	$3,0 \cdot 10^5$	5,48	$4,4 \cdot 10^6$	6,64
<u>K. pneumoniae</u> ($6,9 \cdot 10^5$ /ml)	T ₁	$9,3 \cdot 10^5$	5,97	$1,5 \cdot 10^5$	5,18	$3,8 \cdot 10^6$	6,58
	T ₂	$4,3 \cdot 10^5$	5,63	$7,0 \cdot 10^4$	4,84	$2,1 \cdot 10^6$	6,32
	T ₃	$4,3 \cdot 10^6$	6,63	$7,0 \cdot 10^5$	5,84	$2,1 \cdot 10^7$	7,32
	T ₄	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₅	$2,4 \cdot 10^8$	8,38	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$1,3 \cdot 10^9$	9,11
	T ₆	$7,5 \cdot 10^7$	7,87	$1,4 \cdot 10^7$	7,15	$2,3 \cdot 10^8$	8,36
	T ₇	$4,3 \cdot 10^7$	7,63	$7,0 \cdot 10^6$	6,84	$2,1 \cdot 10^8$	8,32
	T ₈	$4,3 \cdot 10^8$	8,63	$7,0 \cdot 10^7$	7,84	$2,1 \cdot 10^9$	9,32
	T ₉	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58
	T ₁₀	$2,4 \cdot 10^8$	8,38	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$1,3 \cdot 10^9$	9,11
	T ₁₁	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58
	T ₁₂	$9,3 \cdot 10^7$	7,97	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$3,8 \cdot 10^8$	8,58

Numération par la méthode du N.P.P. de S. brancaster L.N.H. 4603 et K. pneumoniae A.T.C.C. 10.031, dans le mélange S. brancaster - K. pneumoniae.

- Action du sélénite après incubation à + 43° C.
- Dénombrement après incubation à + 37° C.

Symboles :

- ▲ K. pneumoniae A.T.C.C10031
- S. brancaster L.M.H 4603
- ⌋ Intervalle de confiance.
- Tracé points par points.

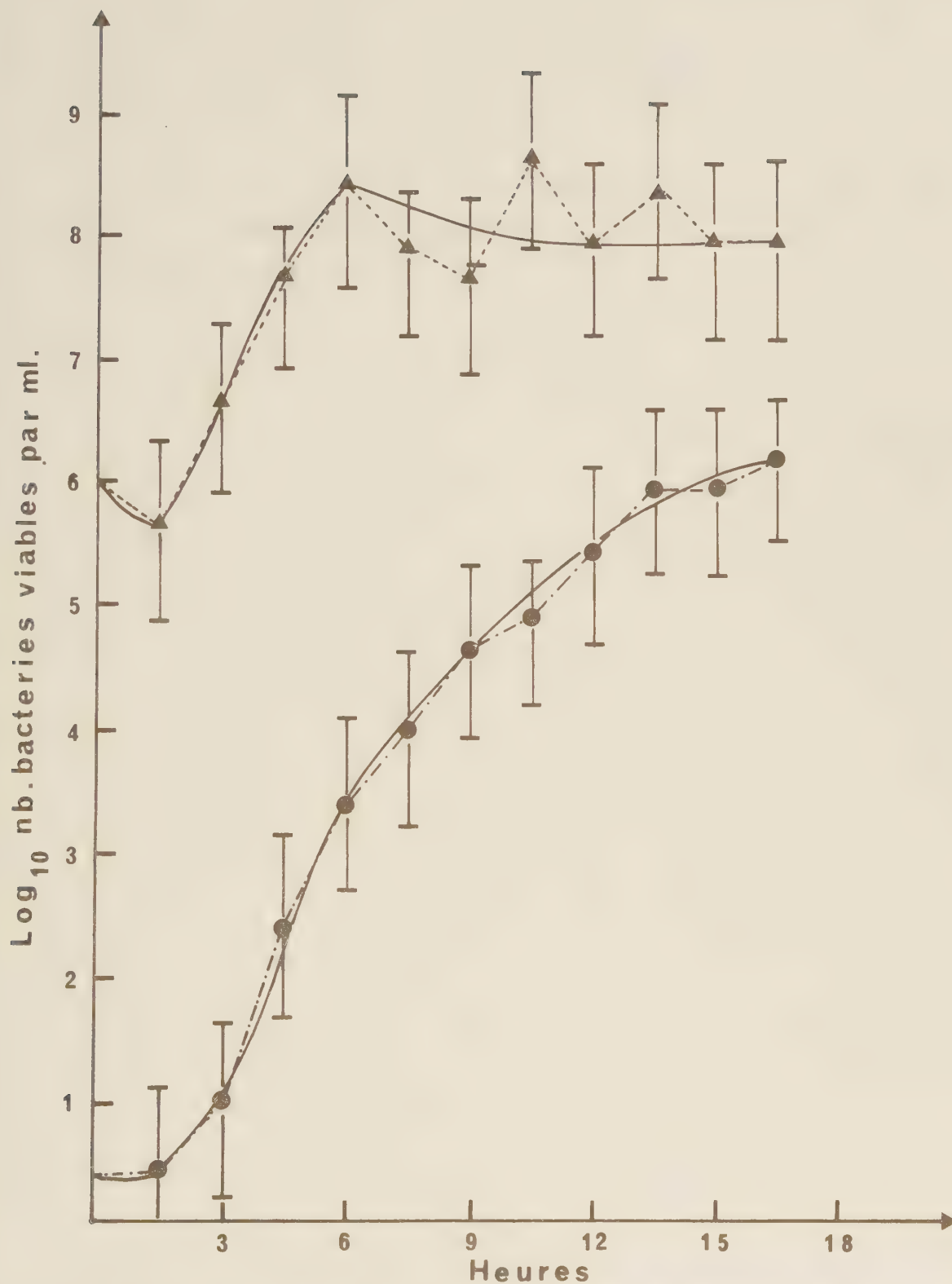


Fig.: 23 - Courbe de croissance de K.pneumoniae et de S.brancaster en culture mixte dans un bouillon d'enrichissement au sélénite après incubation à + 43° C.

La différence des concentrations en bactéries, au début de la croissance, n'est pas compensée au cours du temps par un meilleur développement de S. brancaster. Au contraire, la présence de K. pneumoniae semble limiter sa croissance.

Quel que soit le nombre de Salmonellaensemencées, on arrive, après 18 heures d'incubation, à la même concentration finale (environ 10^6 /ml).

3.2.3.3. Comparaison des courbes de croissance

=====

de S. brancaster, E. coli et K. pneumoniae

* S. brancaster.

La superposition des courbes de croissance de S. brancaster en présence d'E. coli et K. pneumoniae, sur un même graphe Fig. 24, fait ressortir deux points :

- la courbe de croissance de S. brancaster en culture avec K. pneumoniae est identique, dans les premières heures, à la courbe de croissance de S. brancaster en mélange avec E. coli, quelle que soit la concentration en S. brancaster. Ce parallélisme des courbes ne se poursuit pas dans le temps : il y a un décrochement de celle-ci pour atteindre la concentration finale de $10^6/\text{ml}$.
- la concentration finale en S. brancaster est différente, selon qu'elle se trouve en présence d'E. coli ($10^8/\text{ml}$ à $10^9/\text{ml}$) ou K. pneumoniae ($10^6/\text{ml}$).

* E. coli et K. pneumoniae.

De même, la superposition des courbes de croissance d'E. coli et de K. pneumoniae en présence de S. brancaster, sur un même graphique, Fig. 25, montre que :

- les courbes de croissance de K. pneumoniae sont identiques à celles en culture pure.
- si le début des courbes de croissance d'E. coli est semblable on assiste, par la suite, à une reprise de croissance d'E. coli

Symboles :

- ◆ S. brancaster (10^2 /ml) + E. coli (10^6 /ml)
 ◇ S. brancaster (1/ml) + E. coli (10^6 /ml)
 ▼ S. brancaster (10^2 /ml) + K. pneumoniae (10^6 /ml)
 ▽ S. brancaster (1/ml) + K. pneumoniae (10^6 /ml)



Fig.: 24-Comparaison des courbes de croissance de S. brancaster L.M.H. 4603, à des concentrations de 1 et 10^2 /ml, en culture mixte avec :

1°) E. coli L.M.H. 79

2°) K. pneumoniae A.T.C.C. 10031

dans le milieu d'enrichissement au sélénite.

Symboles :

- ◆ E.coli (10^6 /ml) + S.brancaster (10^2 /ml)
- ◇ E.coli (10^6 /ml) + S.brancaster (1/ml)
- ▲ K.pneumoniae (10^6 /ml) + S.brancaster (10^2 /ml)
- △ K.pneumoniae (10^6 /ml) + S.brancaster (1/ml)

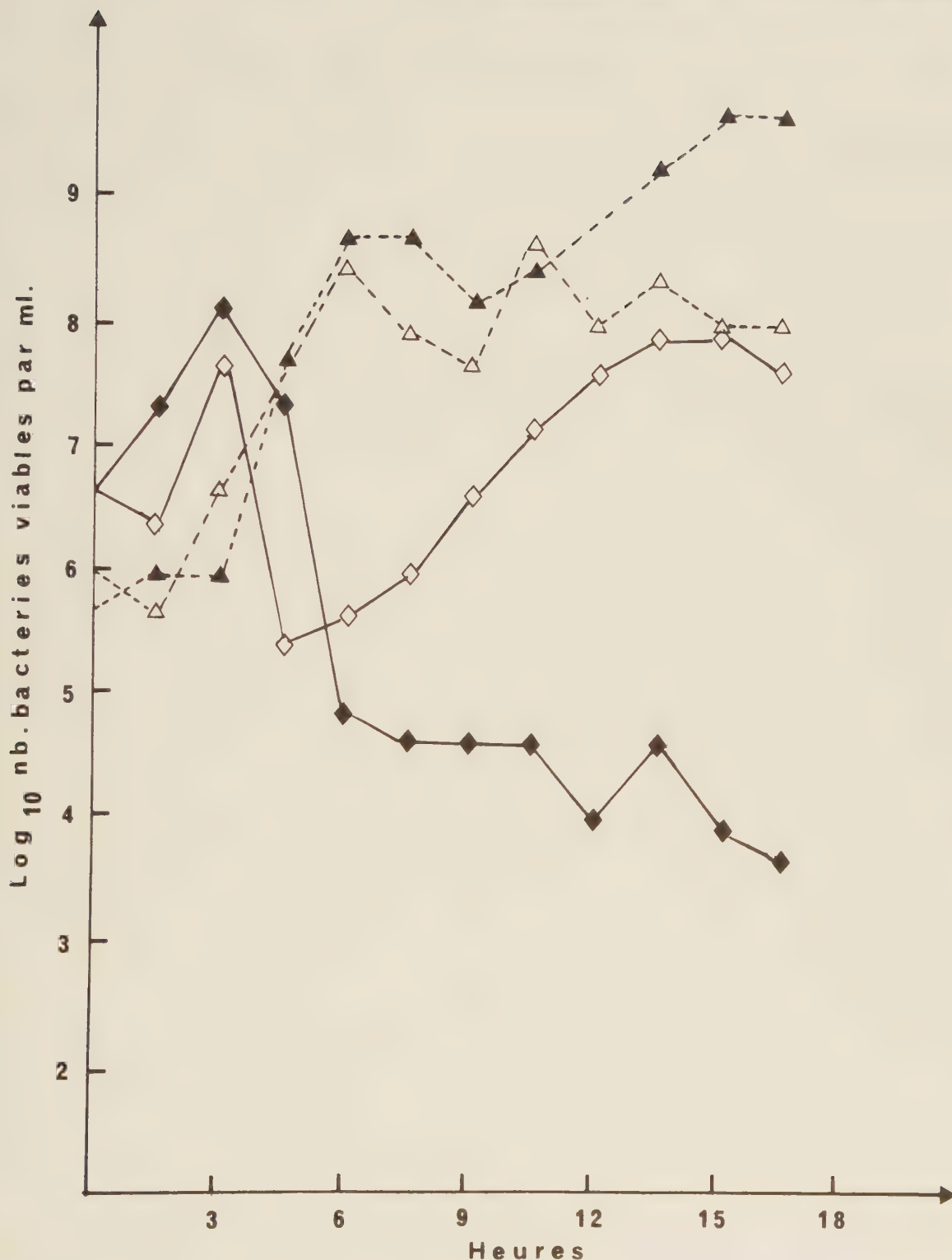


Fig.: 25-Comparaison des courbes de croissance de K.pneumoniae A.T.C.C. 10.031 et d'E.coli L.M.H. 79, à des concentrations de 10^6 /ml, en culture mixte avec S.brancaster L.M.H. 4603, dans le milieu au sélénite.

se trouvant en présence de S. brancaster à la concentration initiale de 1/ml.

Pour l'autre courbe il n'y a pas de reprise de croissance quand E. coli est mis en culture avec 10^2 S. brancaster.

IV. EFFICACITE COMPAREE DES MILIEUX
D'ENRICHISSEMENT AU SELENITE ET AU
TETRATHIONATE POUR LA RECHERCHE DES
Salmonella A PARTIR D'ECHANTILLONS
D'EAU USEE, CENTRIFUGES OU NON.

1. MATERIEL.

1.1. Les prélèvements.

1.1.1. Origine.

Les eaux contrôlées proviennent d'une série de prélèvements effectués dans la station de pré-traitement de FERBER, qui collecte l'ensemble des eaux résiduaires de la ville de NICE (Alpes-Maritimes).

* La station de pré-traitement de FERBER.

L'effluent drainant les égouts correspondant à une population d'environ 400.000 habitants, entre dans la station à une côte située à 3,80 mètres au-dessous du niveau de la mer.

Le relèvement des eaux brutes se fait par l'intermédiaire de six vis d'Archimède assurant chacune un débit de 1000 l/s.

Les déchets et matières en suspension, présents dans les eaux usées, sont alors déchiquetés au moyen de huit dilacérateurs qui permettent chacun le passage de 750 l/s.

A la sortie de ces appareils, l'eau passe dans des bassins de déshuilage. Un brassage de l'eau par air comprimé permet la remontée des corps gras, hydrocarbures, plastiques, etc ... dans des compartiments situés sur les côtés. Les huiles et les corps flottants, repoussés grâce à un pont racleur dans une goulotte, sont égouttés et stockés.

L'effluent est rejeté à la mer après passage dans un collecteur.

* Le lieu de prélèvement.
.....

Tous les prélèvements sont effectués dans les bassins de déshuilage, en aval des dilacérateurs.

La turbulence de l'eau est très importante, permettant ainsi une bonne homogénéisation.

1.1.2. Mode de prélèvement.

* Recueil des eaux.
.....

Un litre d'eau d'égout est recueilli dans des flacons de 1000 ml en verre ordinaire préalablement stérilisés.

Les flacons, lestés par des plaques de plomb, sont immergés dans l'eau à l'aide d'un cordon plastique, relié au flacon par un mousqueton.

La hauteur d'immersion est d'environ 20 cm.

La personne qui effectue les prélèvements est munie de gants en matière plastique.

* Fréquence.
.....

Les prélèvements sont effectués par un agent de notre Service chaque mardi matin entre 8 et 10 heures. La période d'étude s'étend sur 12 mois.

1.1.3. Transport.

Les flacons sont acheminés vers le Laboratoire dans les plus brefs délais : le temps de transport n'excédant pas 20 mn, les échantillons d'eaux sont laissés à la température ambiante. Arrivés au Laboratoire, les échantillons sont placés dans une chambre froide à + 4° C avant leur contrôle.

1.2. Matériel de broyage.

Homogénéiseur.
.....

C'est un appareil à couteaux, type "OMNI-MIXER" SORVALL, modèle 1220. Il est entraîné par un moteur électrique lui imprimant une rotation de 16.000 tours par minute.

Chambres de broyage.
.....

En acier inoxydable 18/8 d'une contenance de 200 ml, chaque chambre est montée avec son couvercle et son axe-couteaux et stérilisée à l'autoclave (+ 120° C - 20 mn).

1.3. Matériel d'agitation.

Le mélange intime des bactéries avec le diluant, la tryptone-sel, (dans des tubes à essais stériles de 160 x 16 mm) est assuré par un agitateur à mouvement Vortex, à vitesse réglable par rhéostat, de type Vortex-Génie.

La mise en route est effectuée par pression du tube sur la tête d'agitation.

1.4. Milieux de culture et réactifs.

● Les bouillons d'enrichissement utilisés dans cette étude sont :

- Bacto-tétrathionate broth base (Difco),
- Bacto-sélénite broth (Difco).

● L'isolement des Salmonella est effectué sur milieu HEKTOEN (Merieux) auquel on ajoute de l'Agar granulé (Merieux) et de la novobiocine (Sté Théraplex).

● Les antibiogrammes sont réalisés sur milieu MUELLER-HINTON (Difco).

1.5. Sérums agglutinants.

Tous les sérums agglutinants anti - Salmonella, O Mélange et O et H monovalents, proviennent de l'Institut Pasteur et de la Sté Welcome.

1.6. Disques pour antibiogrammes.

Les disques utilisés pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques proviennent de l'Institut Pasteur : leur distribution est assurée par un distributeur automatique (Institut Pasteur).

2. METHODES.

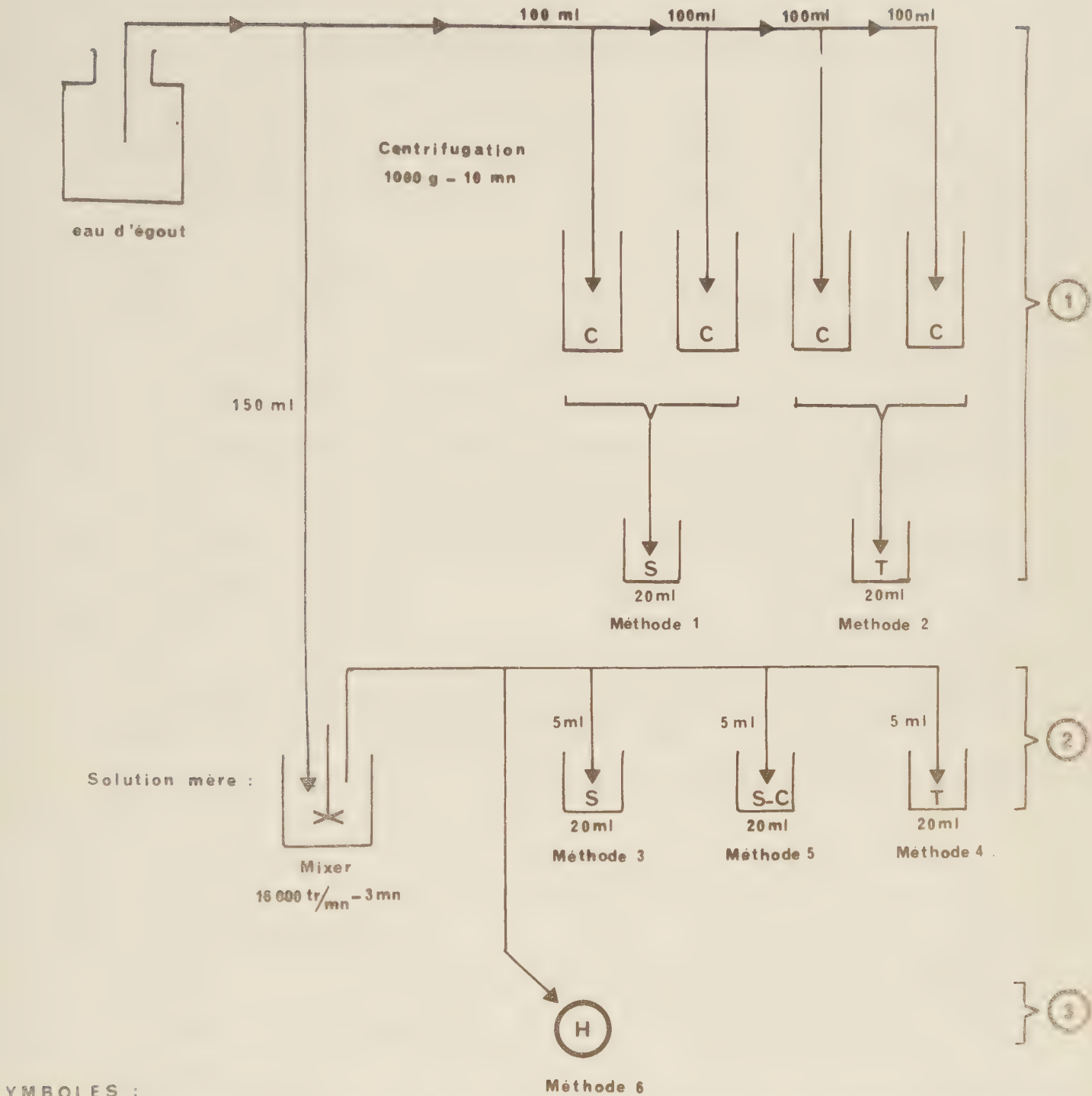
2.1. Préparation de l'échantillon.

A partir d'un litre d'eau d'égout prélevé : 400 ml sont soumis à centrifugation et 150 ml sont destinés à préparer une solution mère. (cf. : Fig. 26)

2.1.1. Obtention d'un culot de centrifugation.

400 ml d'échantillon d'eau d'égout sont répartis dans 4 pots à centrifuger de 100 ml (pots en polycarbonate stérilisés, fermés par un bouchon à vis).

Dans une centrifugeuse réfrigérée, type "Centrifuge 3229", les pots sont soumis à une accélération de 1000 g à + 4° C pendant 10 mn ; le surnageant est rejeté ; le culot est repris par le bouillon d'enrichissement : 20 ml de milieu au sélénite et 20 ml de milieu au tétrathionate servent à remettre en suspension chacun des deux culots de centrifugation. Toutes les cultures sont incubées à + 43° C pendant 24 heures.

SCHEMA D'ANALYSE

2.1.2. Préparation d'une solution mère.

150 ml d'échantillon d'eaux usées sont versés dans une chambre de broyage stérile : après homogénéisation à 16.000 tours, minute, pendant trois minutes, les ensemencements sont effectués :

● Sur les différents milieux d'enrichissement (20 ml),

- bouillon au tétrathionate,
- bouillon au sélénite,
- bouillon au sélénite-cystine,

avec 5 ml de l'échantillon ainsi préparé.

Toutes les cultures sont portées à l'étuve à + 43° C pendant 24 heures.

● Directement en stries sur le milieu HEKTOEN, additionné de novobiocine, avec le contenu d'une anse de platine.

Les plaques de milieu gélosé sont incubées à + 37° C, pendant 24 heures.

2.2. Isolement.

A partir des cultures sur milieux d'enrichissement au tétrathionate et au sélénite un isolement est effectué sur milieu HEKTOEN (A 5).

Deux modifications sont apportées par nos soins à la préparation de ce milieu gélosé :

* adjonction d'Agar.

On dissout 75 g de poudre du milieu HEKTOEN dans 700 ml d'eau distillée stérile. Un chauffage modéré et une agitation continue sont poursuivis jusqu'à l'apparition des premières bulles venant crever à la surface.

Dans les 300 ml d'eau distillée restant, on dissout 6,5 g d'Agar en poudre. On chauffe jusqu'à ébullition.

On mélange les deux préparations en agitant le milieu pour obtenir un litre de milieu HEKTOEN à 20 g/l d'Agar.

* adjonction de novobiocine.

Après refroidissement à + 45° C, on ajoute une solution de novobiocine à raison de 12,5 µg/ml.

On répartit par fraction de 20 ml ce milieu dans des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre.

Les plaques de milieu HEKTOEN peuvent être conservées à + 4° C dans une chambre froide, pendant une semaine, avant utilisation. Après 24 heures d'incubation à + 37° C, cinq colonies bactériennes isolées, vert-bleu, avec ou sans centre noir, convexes, de un à deux mm de diamètre, sont retenues et ensemencées sur milieu de KLIGLER.

2.3. Identification.

A partir de la culture sur milieu de KLIGLER, toutes les souches sont alors soumises aux tests différentiels biochimiques et au diagnostic sérologique comme il est indiqué en I. 3.

2.4. Sensibilité aux antibiotiques.

Les essais de sensibilité ont été effectués en utilisant la technique classique de diffusion en gélose par la méthode des disques.

Des disques imprégnés de substances antibiotiques sont disposés à la surface du milieu gélosé MUELLER-HINTON, préalablement ensemencée avec une suspension d'une culture pure en phase exponentielle de croissance.

Ont été ainsi essayés :

- Trimethoprime + sulfamethoxazole		- B -
- Chloramphenicol	(30 μ g)	- Ch -
- Gentamicine	(30 μ g)	- G -
- Streptomycine	(30 μ g)	- S -
- Tetracycline	(30 μ g)	- T -
- Thiophenicol	(30 μ g)	- Th -
- Oxytetracycline	(30 μ g)	- OT -

La sensibilité ou la résistance de la bactérie est appréciée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance autour du disque.

3. RESULTATS.

3.1. Intérêt de la technique de concentration par centrifugation.

3.1.1. Comparaison de 2 techniques de concentration par centrifugation.

29 échantillons d'eau résiduaire sont centrifugés. Les culots obtenus sont ensemencés simultanément :

- sur milieu au sélénite (méthode 1),
- sur milieu au tétrathionate (méthode 2).

Le Tableau XXI montre que le nombre d'échantillons positifs est identique quelle que soit la technique utilisée.

TABLEAU XXI

Recherche des Salmonella selon les méthodes (1) et (2).

Méthodes Analyses n°	Culot de centrifugation inoculé dans milieu d'enrichissement	
	au sélénite (1)	au tétrathionate (2)
1	+	+
2	-	-
3	-	-
4	+	+
5	+	+
6	-	-
7	+	-
8	-	-
9	+	-
10	-	-
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	+	+
15	-	-
16	-	+
17	-	-
18	+	+
19	-	-
20	-	-
21	+	+
22	+	+
23	+	-
24	+	-
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
Nombre total d'échantillons	29	
Nombre total d'échantillons positifs	16	16

Aucune différence significative ne peut être mise en évidence : dans l'une et l'autre méthode, le rapport entre le nombre d'échantillons traités (29) et le nombre d'échantillons positifs (16) est le même, soit 55 %.

Le Tableau XXII rend compte du nombre d'échantillons positifs et négatifs qui ont été révélés simultanément ou séparément par les deux méthodes.

TABLEAU XXII

Comparaison de deux techniques de concentration (1) et (2) pour la recherche des Salmonella.

Techniques			Culot inoculé sur Tétrathionate (2)		Total
			Echantillons		
			+	-	
Culot inoculé sur Sélénite (1)	Echantillons	+	12	4	16
		-	4	9	13
Total			16	13	29

Le nombre de sérotypes isolés, par l'application des deux méthodes est de 14. Ce sont par ordre de fréquence, comme l'indique le Tableau XXIII :

- Pour la méthode (1) :

. S. wien (33,3 %)

TABLEAU XXIII

Fréquence de distribution, par sérotypes, des souches de Salmonella isolées, selon deux techniques de concentration.
(1) & (2)

SÉROTYPES	Culot de centrifugation			
	enrichissement au Sélénite (1)		enrichissement au Tétrathionate (2)	
	Nombre	%	Nombre	%
<u>S. abony</u>	0	0	1	4,2
<u>S. brandenburg</u>	5	20,8	2	8,3
<u>S. derby</u>	1	4,2	0	0
<u>S. give</u>	0	0	2	8,3
<u>S. infantis</u>	1	4,2	0	0
<u>S. kottbus</u>	1	4,2	1	4,2
<u>S. newington</u>	0	0	1	4,2
<u>S. newport</u>	1	4,2	2	8,3
<u>S. paratyphi B</u>	2	8,3	3	12,5
<u>S. saint paul</u>	1	4,2	2	8,3
<u>S. typhi murium</u>	3	12,5	7	29,2
<u>S. virchow</u>	0	0	1	4,2
<u>S. wien</u>	8	33,3	2	8,3
<u>S. 4. 5. 12 :-:-</u>	1	4,2	0	0
Nombre total de souches	24		24	
Nombre total d'échantillons positifs	16		16	
Nombre total d'échantillons	29			
Nombre de sérotypes différents	10		11	

(1) après centrifugation, une partie du culot est inoculé sur milieu au sélénite.

(2) après centrifugation, une partie du culot est inoculé sur milieu au tétrathionate.

- . S. brandenburg (20,8 ‰)
- . S. typhi murium (12,5 ‰)
- . S. paratyphi B (8,3 ‰)
- . S. derby, S. infantis, S. kottbus, S. newport,
S. saint paul (4,2 ‰).
- Pour la méthode (2) :
 - . S. typhi murium (29,2 ‰)
 - . S. paratyphi B (12,5 ‰)
 - . S. brandenburg, S. give, S. newport, S. saint paul,
S. wien (8,3 ‰)
 - . S. abony, S. kottbus, S. newington, S. virchow (4,2 ‰).

3.1.2. Comparaison de la technique de concentration
par centrifugation avec la technique d'enrichis-
sement direct.

* Comparaison de la méthode (1) avec la méthode d'enrichissement
direct sur milieu:

- sélénite - méthode (3) -
- sélénite-cystine - méthode (5) -

Les résultats fournis par le Tableau XXIV nous permettent de comparer le même milieu d'enrichissement au sélénite après centrifugation ou non de l'échantillon.

TABLEAU XXIV

Recherche des Salmonella selon les méthodes (1) (3) et (5).

Méthodes Analyses n°	Culot de centrifugation dans Sélénite (1)	Enrichissement direct dans	
		Sélénite (3)	Sélénite - Cystine (5)
1	+	-	+
2	-	-	-
3	-	+	-
4	+	-	+
5	+	-	-
6	-	-	-
7	+	+	-
8	-	-	-
9	+	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	+	-	-
24	+	-	-
26	+	+	+
27	+	+	+
28	+	+	-
Nombre total d'échantillons	18		
Nombre total d'échantillons positifs	10	5	4

Nous relevons que sur les 18 échantillons analysés 10 sont positifs, soit 56 % dans la méthode (1) tandis que 5 le sont dans la méthode (3), soit 28 %.

La comparaison de la méthode (1) avec la méthode (5) marque d'avantage la supériorité des résultats obtenus en employant la technique de concentration par centrifugation : le nombre d'échantillons positifs après enrichissement sur milieu au sélénite - cystine est relativement faible 4 sur 18, soit 22 %.

Les résultats consignés dans les Tableaux XXV et XXVI font ressortir que le nombre d'échantillons trouvés positifs simultanément dans les méthodes (1) et (3) est le même que celui trouvé dans les méthodes (1) et (5) : 4.

TABLEAU XXV
Comparaison des techniques (1) et (3)
pour la recherche des Salmonella .

TECHNIQUES			Culot inoculé sur Sélénite (1)		TOTAL
			Echantillons		
			+	-	
Enrichissement direct sur Sélénite (3)	Echantillons	+	4	1	5
		-	6	7	13
TOTAL			10	8	18

La lecture des résultats du Tableau XXVII montre que, le nombre de sérotypes différents mis en évidence à partir des échantillons positifs est relativement important :

- 8 sur 10 pour la méthode (1),
- 5 sur 5 pour la méthode (3),
- 4 sur 4 pour la méthode (5).

TABLEAU XXVI

Comparaison des techniques (1) et (5)
pour la recherche des Salmonella .

TECHNIQUES			Culot inoculé sur Sélénite (1)		TOTAL
			Echantillons		
			+	-	
Enrichissement direct sur Sélénite-cystine(5)	Echantillons	+	4	0	4
		-	6	8	14
TOTAL			10	8	18

TABLEAU XXVII

Fréquence de distribution, par sérotypes, de souches de Salmonella isolées selon les techniques (1), (3) et (5).

SÉROTYPES	Culot de centrifugation dans Sélénite (1)		Enrichissement direct			
			Sélénite (3)		Sélénite-cystine(5)	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
<u>S. brandenburg</u>	2	13,3	1	12,5	0	0
<u>S. derby</u>	1	6,7	0	0	0	0
<u>S. infantis</u>	1	6,7	0	0	1	20
<u>S. java</u>	0	0	2	25	1	20
<u>S. kottbus</u>	1	6,7	0	0	0	0
<u>S. newington</u>	0	0	0	0	1	20
<u>S. newport</u>	1	6,7	0	0	0	0
<u>S. paratyphi B</u>	0	0	2	25	0	0
<u>S. typhi murium</u>	1	6,7	1	12,5	0	0
<u>S. wien</u>	6	40	2	25	2	40
<u>S. 4,5,12 :---</u>	1	6,7	0	0	0	0
Nombre total de souches	13		8		5	
Nombre total d'échantillons positifs	10		5		4	
Nombre total d'échantillons	18					
Nombre de sérotypes différents	8		5		4	

* Comparaison de la méthode (2) avec la méthode d'enrichissement direct sur milieu au Tétrathionate - méthode (4) -

Les résultats du Tableau XXVIII mettent en évidence que l'utilisation de la méthode de concentration par centrifugation n'est pas nécessaire pour isoler des Salmonella.

TABLEAU XXVIII
Recherche des Salmonella selon les méthodes (2) et (4).

Méthodes Analyses n°	Culot de centrifugation dans Tétrathionate(2)	Enrichissement direct dans Tétrathionate (4)
14	+	+
15	-	-
16	+	+
17	-	+
18	+	-
19	-	-
20	-	+
21	+	-
22	+	+
23	-	-
24	-	-
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
Nombre total d'échantillons	16	
Nombre total d'échantillons positifs	10	10

Sur 16 échantillons traités par enrichissement direct sur bouillon au tétrathionate - méthode (4) -, 10 sont positifs soit 62,5 %. La méthode (2) présente un pourcentage d'efficacité identique (62,5 %).

Le Tableau XXIX montre que sur les 16 échantillons analysés 4 seulement, négatifs par la méthode (1), le sont aussi par la méthode (2) et que 8 échantillons sont positifs simultanément par l'emploi des 2 méthodes.

TABLEAU XXIX

Comparaison des techniques (2) et (4) pour la recherche des Salmonella.

TECHNIQUES			Culot inoculé sur Tétrathionate (2)		TOTAL
			Echantillons		
			+	-	
Enrichissement direct sur tétrathionate (4)	Echantillons	2	8	2	10
		1	2	4	6
TOTAL			10	6	16

L'observation du Tableau XXX montre que la fréquence d'isolement de S. typhi murium à partir de la méthode (4) est aussi importante que celle notée dans la méthode (2).

Bien que S. wien ait été isolée sur bouillon d'enrichissement au tétrathionate, on note néanmoins un pourcentage de positivité plus faible sur ce milieu comparé au milieu d'enrichissement au sélénite.

TABLEAU XXX

Fréquence de distribution par sérotypes, des souches de Salmonella isolées selon les techniques (2) & (4)

SEROTYPES	Culot de centrifugation dans Tétrathionate (2)		Enrichissement direct dans Tétrathionate (4)	
	Nombre	‰	Nombre	‰
<u>S. abony</u>	1	6,3	1	6,3
<u>S. anatum</u>	0	0	1	6,3
<u>S. brandenburg</u>	1	6,3	1	6,3
<u>S. derby</u>	0	0	1	6,3
<u>S. give</u>	2	12,5	0	0
<u>S. java</u>	0	0	1	6,3
<u>S. kottbus</u>	1	6,3	2	12,5
<u>S. newport</u>	1	6,3	1	6,3
<u>S. paratyphi B</u>	2	12,5	1	6,3
<u>S. saint paul</u>	1	6,3	2	12,5
<u>S. typhimurium</u>	5	31,3	4	25
<u>S. wien</u>	2	13,3	1	6,3
Nombre total de souches	16		16	
Nombre total d'échantillons positifs	10		10	
Nombre total d'échantillons	16			
Nombre de sérotypes différents	9		10	

3.1.3. Comparaison de la technique de concentration par centrifugation avec la technique d'ensemencement direct sur milieu HEKTOEN.

Les résultats du Tableau XXXI montrent que sur les 24 échantillons traités seulement 4 sont positifs (16,6 %).

Les chances de réussite d'isoler des Salmonella sont très faibles.

TABLEAU XXXI

Recherche des Salmonella selon les méthodes (1), (2) et (3).

Méthodes analyses n°	Culot de centrifugation dans		Ensemencement direct sur milieu HEKTOEN (3)
	Gélénite (1)	Tétrathionate (2)	
1	+	+	-
2	-	-	-
3	-	-	+
4	+	+	-
5	+	-	-
6	-	-	-
7	+	-	-
8	-	-	-
9	+	-	+
10	-	-	-
11	-	+	+
12	-	-	-
13	-	+	-
14	+	+	-
15	-	-	-
16	-	+	-
17	-	-	-
18	+	+	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	+	+	-
22	+	+	-
23	+	-	-
24	+	-	-
Nombre total d'échantillons			
Nombre total d'échantillons positifs	11	11	1

2 sérotypes différents ont été isolés (cf Tableau XXVII).

3.1.4. Comparaison globale des méthodes.

Le Tableau XXXII qui rend compte des résultats globaux obtenus par les différentes méthodes fait ressortir que la distribution des sérotypes de Salmonella est très aléatoire.

Un sérotype trouvé par l'une des méthodes n'est pas forcément isolé par les autres méthodes. On augmente le nombre des sérotypes en multipliant le nombre des méthodes.

Le nombre maximum de sérotypes différents isolés par échantillons n'a jamais été supérieur à 3 : sur tous les échantillons positifs, 4 seulement ont eu 3 sérotypes différents, tandis que 18 ont présenté 2 sérotypes différents.

La présence d'un seul sérotype dans un échantillon n'implique pas que, sur les 5 colonies prélevées à partir des plaques de milieu gélosé, il n'y ait pas d'autres souches de Salmonella du même sérotype : nous n'avons signalé que les souches de sérotypes différents.

3.2. Recherche des *Salmonella* après enrichissement direct simultanément sur bouillons au tétrathionate et au sélénite.

Les résultats enregistrés dans le Tableau XXXIII permettent de comparer des milieux d'enrichissement au sélénite et au tétrathionate.

TABLEAU XXXIII
Recherche des *Salmonella* selon les méthodes (3) & (4).

Méthodes Analyse n°	Enrichissement direct sur milieu d'enrichissement	
	au Sélénite (3)	au Tétrathionate (4)
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	-	+
30	+	+
38	-	+
39	+	+
42	+	+
43	+	+
44	+	-
45	+	+
46	-	-
47	+	+
48	+	-
49	+	+
50	+	-
51	+	+
52	+	+
53	+	+
54	+	+
55	-	-
56	-	-
57	+	-
58	+	+
60	+	+
62	+	-
63	+	-
64	+	-
65	+	+
66	+	-
67	+	-
68	+	-
69	+	-
70	+	+
Nombre total d'échantillons	35	
Nombre total d'échantillons	30	21

Dans le premier cas, après passage sur milieu d'enrichissement au sélénite - méthode (3) -, sur les 35 échantillons d'eau d'égoût analysés, 30 sont positifs, soit 85 %.

Dans le deuxième cas, sur le même nombre d'échantillons traités par la méthode (4), enrichissement sur milieu au tétrathionate, 21 sont positifs, soit 60 %. Le pourcentage de positivité est plus élevé en utilisant la méthode (3).

L'examen du Tableau XXXIV montre que dans 3 cas seulement on a constaté simultanément dans les 2 méthodes l'absence de Salmonella. Sur l'ensemble des échantillons traités, 13 ne se sont révélés positifs que dans l'un des 2 milieux d'enrichissement.

TABLEAU XXXIV

Comparaison des techniques (3) et (4)
pour la recherche des Salmonella.

TECHNIQUES			Enrichis. [†] direct sur Tétrathionate(4)		TOTAL
			Echantillons		
			+	-	
Enrichissement direct sur Sélénite (3)	Echantillons	+	19	11	30
		-	2	3	5
TOTAL			21	14	35

Du point de vue nombre et variétés de sérotypes, comme l'indique le Tableau XXXV, les résultats sont bien supérieurs avec le milieu d'enrichissement au tétrathionate qui totalise 18 sérotypes différents contre 12 avec le milieu d'enrichissement au sélénite, soit 1/3 de fois plus pour un nombre inférieur d'échantillons positifs.

Le nombre de souches isolées est plus important par l'application de la méthode (3).

Quoi qu'il en soit les proportions de résultats positifs sont élevées dans l'une ou l'autre méthode. 84 souches de Salmonella ont été isolées à partir de 51 échantillons positifs. Le nombre de sérotypes trouvés est de 19. Ce sont par ordre de fréquence pour les principaux :

- méthode (3) :

- . S. wien (45 %)
- . S. paratyphi B (17,4 %)
- . S. brandenburg (13 %)

- méthode (4) :

- . S. wien (15,9 %)
- . S. brandenburg (13 %)
- . S. panama, S. paratyphi B, S. typhi murium
(7,9 %)

Ce qui est remarquable, c'est qu'environ la moitié des souches isolées à partir du bouillon au sélénite correspond au sérotype S. wien (45 %). Comparativement, pour les mêmes échantillons seulement 15,9 % de S. wien ont été mis en évidence après passage sur milieu au tétrathionate.

De même pour S. paratyphi B, le milieu d'enrichissement au sélénite semble être plus favorable à son isolement par la suite (17,4 %).

TABLEAU XXXV

Fréquence de distribution par sérotypes, des souches de Salmonella isolées selon les techniques (3) et (4).

SEROTYPES	Sélénite (3)		Tétrathionate (4)	
	Nombre	%	Nombre	%
<u>S. abony</u>	0	0	1	2,6
<u>S. agona</u>	1	2,2	0	0
<u>S. anatum</u>	0	0	2	5,3
<u>S. brandenburg</u>	6	13	5	13
<u>S. derby</u>	1	2,2	1	2,6
<u>S. heidelberg</u>	0	0	1	2,6
<u>S. infantis</u>	1	2,2	1	2,6
<u>S. java</u>	2	4,4	1	2,6
<u>S. kottbus</u>	0	0	2	5,3
<u>S. montevideo</u>	0	0	1	2,6
<u>S. muenster</u>	1	2,2	2	5,3
<u>S. panama</u>	1	2,2	3	7,9
<u>S. paratyphi B</u>	8	17,4	3	7,9
<u>S. saint paul</u>	0	0	2	5,3
<u>S. tennessee</u>	0	0	2	5,3
<u>S. typhi murium</u>	2	4,3	3	7,9
<u>S. wien</u>	21	45	6	15,9
<u>S. 4,5,12 :-:-</u>	1	2,2	1	2,6
<u>S. 4,5,12 :b:-</u>	1	2,2	1	2,6
Nombre total de souches	46		38	
Nombre total d'échantillons positifs	30		21	
Nombre total d'échantillons	35			
Nombre de sérotypes différents	12		18	

Le sérotype S. brandenburg est aussi bien retrouvé dans le bouillon au sélénite que dans le bouillon au tétrathionate (13 %).

L'état comparatif des méthodes (3) et (4) indiqué par le Tableau XXXVI rend compte de la répartition des sérotypes dans chacun des échantillons analysés.

Dans 3 cas seulement nous avons retrouvé totalement les mêmes sérotypes dans l'une et l'autre méthode utilisée.

La plupart du temps, chacun des deux milieux d'enrichissement met en évidence des sérotypes différents.

Le nombre maximum de sérotypes différents trouvés dans un échantillon a été de 4. Deux fois, nous en avons isolé 4 provenant des 5 colonies prélevées à partir du milieu HEKTOEN. Sur l'ensemble des échantillons positifs, 9 ont révélé 3 sérotypes différents. La majorité des autres échantillons a révélé 1 ou 2 sérotypes.

TABLEAU XXXVI

Etat comparatif des méthodes (3) et (4)
en fonction des souches isolées.

METHODES					
N°	(3)	(4)	N°	(3)	(4)
1	-	0	37	0	+ (16, 19)
2	-	0	38	-	+ (16, 18, 19, ...)
3	+ (17)	0	39	+ (2, 21)	+ (8)
4	-	0	40	0	+ (15)
5	-	0	41	0	+ (6, 13, 16)
6	-	0	42	+ (16)	+ (12, 13)
7	+ (2, 17)	0	43	+ (6, 21)	+ (7, 13, 19)
8	-	0	44	+ (4, 21)	-
9	-	0	45	+ (4, 17, 21)	+ (3, 4, 6)
10	-	0	46	-	-
11	-	0	47	+ (17)	+ (4)
12	-	0	48	+ (8)	-
13	-	0	49	+ (21)	+ (4, 21)
14	-	0	50	+ (21)	-
15	0	-	51	+ (21)	+ (4, 13)
16	0	+ (6, 9)	52	+ (4, 9, 21)	+ (9)
17	0	+ (14)	53	+ (21)	+ (21)
18	0	-	54	+ (17, 21)	+ (21)
19	0	-	55	-	-
20	0	+ (18)	56	-	-
21	0	-	57	+ (21)	-
22	0	+ (18, 20)	58	+ (21, 23)	+ (16, 21, 23)
23	0	-	59	+ (17, 21, 22)	0
24	0	-	60	+ (17, 21)	+ (17)
25	+ (20, 21)	+ (20)	61	+ (17)	0
26	+ (21)	+ (20, 21)	62	+ (17, 22)	-
27	+ (9, 20, 21)	+ (10, 20)	63	+ (21)	-
28	+ (4)	+ (10)	64	+ (21)	-
29	-	+ (1, 3, 4)	65	+ (17)	+ (17)
30	+ (17)	+ (17)	66	+ (17)	-
31	0	+ (19)	67	+ (4, 21)	-
32	0	+ (11, 16)	68	+ (4, 21)	-
33	0	+ (2, 12)	69	+ (13)	-
34	0	+ (5, 6, 8, 21)	70	+ (21)	+ (13, 21)
35	0	+ (5, 14)	71	+ (13, 21)	0
36	0	+ (4, 9)	72	-	0

Méthode 3 = Enrichissement direct sur bouillon au Sélénite.

Méthode 4 = " " " " " Tétrathionate

<u>S. abony</u>	11 - <u>S. livingstone</u>
<u>S. agona</u>	12 - <u>S. montevideo</u>
<u>S. anatum</u>	13 - <u>S. anatum</u>
<u>S. braun-eburg</u>	14 - <u>S. braun-eburg</u>
<u>S. brucellae</u>	15 - <u>S. brucellae</u>
<u>S. derby</u>	16 - <u>S. derby</u>
<u>S. heidelberg</u>	17 - <u>S. paratyphi B</u>
<u>S. infantis</u>	18 - <u>S. saint-pauli</u>
<u>S. java</u>	19 - <u>S. tennessae</u>
<u>S. kottbus</u>	20 - <u>S. typhi murium</u>

21 - <u>S. wien</u>
22 - <u>S. 4, 5, 12 : - : -</u>
23 - <u>S. 4, 5, 12 : b : -</u>

+ : présence de Salmonella.

- : absence de Salmonella.

0 : analyse non recherchée.

3.3. Traitement statistique des données.

Il s'agit de savoir si les pourcentages observés de succès, selon les méthodes employées diffèrent significativement. L'approche méthodologique la plus simple qui s'impose pour résoudre ce problème est évidemment celle qui s'appuie sur la technique du X^2 corrigé (172).

La valeur du X^2 corrigé est calculée à partir de la formule suivante :

$$X^2_c = \frac{N \left[(ad - bc) - \frac{N}{4} \right]^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

3.3.1. Comparaison de la méthode de concentration par centrifugation avec les méthodes d'enrichissement direct.

* Méthode (1) - Méthode (3).

Les pourcentages observés de succès, d'après le Tableau XXIV, ont été pour :

- méthode (1), 10 échantillons positifs sur 18, soit 56 %,
- méthode (3), 5 échantillons positifs sur 18, soit 28 %.

Pour comparer les méthodes, à partir des résultats obtenus, nous dressons le Tableau XXXVII, tableau de contingence.

TABLEAU XXXVII

Résultats Méthodes	⊕	⊖	Total
1	a 10	b 8	18
3	c 5	d 13	18
Total	15	21	N 36

+ présence de Salmonella
- absence de Salmonella

Le χ^2_c évalué à partir de ce tableau est de 1,83. Avec un nombre de degré de liberté égal à 1 cette valeur est inférieure à la valeur limite 3,84 correspondant à un seuil de confiance de 0,95.

Il est donc raisonnable de conclure que la mise en évidence des Salmonella après concentration par centrifugation ou par enrichissement direct sur milieu au sélénite ne diffère pas significativement.

* Méthode (1) - Méthode (5).
.....

Le nombre d'échantillons positifs par rapport au nombre total d'échantillons traités est, d'après le Tableau XXIV :

- méthode (1), 10 sur 18, soit 56 %,
- méthode (5), 4 sur 18, soit 22 %.

Le tableau XXXVIII à double entrée donne une valeur du χ^2_c (2,92) inférieure au seuil de signification de 5 % (3,84).

TABEAU XXXVIII

Résultats Méthodes	⊕	⊖	Total
1	a 10	b 8	18
5	c 4	d 14	18
Total	14	22	N 36

+ présence de Salmonella
- absence de Salmonella

Les chances de succès d'isoler des Salmonella ne sont pas plus élevées en utilisant la méthode de concentration par centrifugation que celles correspondant à l'enrichissement direct par le Sélénite - cystine.

* Méthode (2) - Méthode (4).

Les proportions observées de succès (cf Tableau XXVIII) étant les mêmes pour les 2 méthodes (10/16) aucune différence significative ne peut être mise en évidence.

3.3.2. Comparaison de la méthode de concentration par centrifugation avec la méthode d'isolement direct

Les calculs, conduits suivant le même processus, permettent de comparer les résultats des :

- méthode (1) }
- méthode (2) } avec la méthode (6) - cf. Tableau XXXI

La valeur X^2_c (3,49) évaluée à partir du Tableau XXXIX inférieure à 3,84, seuil pour une sécurité de 0,95, montre qu'il n'existe aucune différence significative quant à la supériorité des méthodes (1) et (2) sur la méthode (6).

TABEAU XXXIX

Résultats Méthodes	+	-	Total
1 et 2	a 11	b 13	24
6	c 4	d 20	24
Total	15	33	N 48

+ présence de Salmonella
- absence de Salmonella

3.3.3. Comparaison des méthodes d'enrichissement direct - Sélénite (3) et Tétrathionate (4) -

A partir des résultats consignés dans le Tableau XXXIII, nous dressons le Tableau de contingence XL. L'examen de ce dernier nous permet de déduire une valeur du X^2_c égal à 4,62. La différence entre les deux méthodes est significative car la valeur du X^2_c est supérieure au seuil de signification de 5 %.

TABLEAU XL

Résultats Méthodes	⊕	⊖	Total
3	a 30	b 5	35
4	c 21	d 14	35
Total	51	19	70

+ présence de Salmonella
- absence de Salmonella

La recherche des Salmonella est donc favorisée par l'emploi du bouillon au sélénite.

Remarques :

* Si on élimine les échantillons qui n'ont pas de Salmonella, quelle que soit la méthode d'enrichissement utilisée, (cf. Tableau XXXIII), nous avons 32 échantillons sur 35 qui en contiennent.

Les pourcentages de succès sont alors :

- pour la méthode (3), 30/32,
- pour la méthode (4), 21/32.

L'étude du Tableau XLI donne une valeur du X^2_c (6,17) très supérieure au seuil de signification de 5 %. Ceci confirme la supériorité du bouillon au sélénite.

TABLEAU XLI

Résultats Méthodes	⊕	⊖	Total
3	a 30	b 2	32
4	c 21	d 11	32
Total	51	13	N 64

+ présence de Salmonella
 - absence de Salmonella

* Si on se réfère au nombre d'échantillons trouvés positifs et négatifs par l'application de la méthode (4), le pourcentage de positivité de la méthode (3) est alors, d'après le Tableau XXXIII :

- 19/21 parmi les échantillons positifs	}	dans le milieu au Tétrathionate
- 11/14 parmi les échantillons négatifs		

D'après le tableau de contingence XXXIV, ces deux pourcentages ne diffèrent pas significativement ($\chi^2_c = 0,24$).

Le succès de la méthode (3) est indépendant de celui de la méthode (4) : les chances d'isoler des Salmonella dans le milieu au sélénite sont toujours les mêmes quels que soient les résultats donnés par le milieu au tétrathionate.

